

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

Aspekte deregulierter Genexpression im Hepatoblastom

Aspects of dysregulated gene expression in hepatoblastoma

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Alexandra Elisabeth Wagner

aus

Deggendorf

2020

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Heiko Hermeking

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

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2021

Eidesstattliche Versicherung

Wagner, Alexandra Elisabeth

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

„Aspekte deregulierter Genexpression im Hepatoblastom“

Selbstständig 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 Beziehung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

München, 08.02.2021

Alexandra Elisabeth Wagner

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	VII
ABSTRACT	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 HEPATOBLASTOM	1
1.1.1 <i>Epidemiologie und klinische Aspekte</i>	1
1.1.2 <i>Genetische Veränderungen</i>	3
1.1.3 <i>Deregulierte Transkriptionsprofile im HB</i>	4
1.1.4 <i>Risikostratifizierung anhand klinischer Parameter</i>	4
1.1.5 <i>Metastasierung</i>	6
1.1.6 <i>Molekulare Marker im HB</i>	9
1.2 ZIELE DER ARBEIT	12
2 MATERIAL	13
2.1 ZELLINIEN.....	13
2.2 ZELLKULTURMATERIALIEN	13
2.3 BAKTERIEN.....	13
2.4 PLASMIDE UND siRNAs	13
2.5 ENZYME	14
2.6 ANTIKÖRPER	14
2.7 KITS	15
2.8 PUFFER UND LÖSUNGEN	15
2.9 PRIMER UND OLIGOS	17
2.10 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	18
2.11 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	20
2.12 LABOR AUSSTATTUNG.....	21
2.13 SOFTWARE UND WEBTOOLS.....	22
3 METHODEN	24
3.1 PATIENTEN.....	24
3.2 PROKARYOTISCHE KULTUREN	24
3.2.1 <i>Kultivierung und Lagerung von E.coli-DH5α</i>	24
3.2.2 <i>Transformation von E.coli-DH5α mit Plasmid-DNA</i>	24
3.3 EUKARYOTISCHE ZELLKULTUREN.....	24
3.3.1 <i>Zellkulturbedingungen</i>	24
3.3.2 <i>Einfrieren und Auftauen von Zelllinien</i>	25
3.4 PROLIFERATIONSASSAY	25
3.5 WOUND HEALING ASSAY	25
3.6 BOYDEN CHAMBER ASSAY	25
3.7 KLONOGENER ASSAY	26
3.8 LUCIFERASE ASSAY	26
3.9 DNA-METHODEN.....	26
3.9.1 <i>Isolation von genomischer DNA</i>	26
3.9.2 <i>Isolation von Plasmid-DNA</i>	27

3.9.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	27
3.9.4	<i>Restriktionsverdau</i>	27
3.9.5	<i>DNA-Ligation</i>	28
3.9.6	<i>Sanger-Sequenzierung</i>	28
3.9.7	<i>DNA-Transfektion</i>	28
3.9.8	<i>Analytische Gelelektrophorese</i>	29
3.9.9	<i>Bisulfitkonvertierung</i>	29
3.9.10	<i>Globale DNA-Methylierungsanalyse</i>	29
3.9.11	<i>Pyrosequenzierung</i>	30
3.10	RNA-METHODEN	31
3.10.1	<i>Isolierung von RNA</i>	31
3.10.2	<i>RNA-Sequenzierung</i>	31
3.10.3	<i>Reverse Transkription (RT)</i>	32
3.10.4	<i>Quantitative real-time PCR (Q-PCR)</i>	32
3.10.5	<i>Transfektion von siRNA</i>	33
3.11	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	33
3.11.1	<i>Isolierung von Proteinen</i>	33
3.11.2	<i>Quantifizierung von Proteinen</i>	33
3.11.3	<i>Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	34
3.12	IMMUNOLOGISCHE NACHWEISVERFAHREN	34
3.12.1	<i>Western Blot (WB)</i>	34
3.12.2	<i>Immunfluoreszenz (IF)</i>	34
3.12.3	<i>Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)</i>	35
3.13	STATISTISCHE AUSWERTUNG	36
4	ERGEBNISSE	37
4.1	DIE HETEROGENITÄT VON PÄDIATRISCHEN LEBERTUMOREN ANHAND GLOBALER METHYLIERUNGSMUSTER	37
4.1.1	<i>Epigenetische Subgruppen kindlicher Lebertumore unterscheiden sich in ihrer genomischen Stabilität und der CpG-Insel-Methylierung</i>	37
4.1.2	<i>Der epigenetische Fußabdruck und seine prognostischen Implikationen im HB..</i>	41
4.1.3	<i>Globale Genexpressionmuster im HB spiegeln epigenetische Klassifizierung wider</i>	42
4.1.4	<i>Die Integration von Methylom- und Transkriptom-Daten identifiziert das TRIM71-HMGA2-LIN28B-IGF2BP1/3-Netzwerk als Marker des G2-Clusters</i>	45
4.1.5	<i>TRIM71 fördert die proliferativen und selbsterneuernden Eigenschaften von Hepatomzelllinien</i>	49
4.2	MIR-483 ALS PRÄDIKTIVER MARKER DES GESAMTÜBERLEBENS IN HB-PATIENTEN	52
4.2.1	<i>Evaluation der vier-miR-Signatur in einer unabhängigen Patientenpopulation</i>	53
4.2.2	<i>Verbesserte Risikostratifizierung durch Integration von miR-483 in die vier-miR-Signatur</i>	54
4.3	DIE SP8-FGF8-ACHSE ALS PROGNOTISCHER FAKTOR IN METASTASIIERTEN HBs MIT SCHLECHTER PROGNOSE	55
4.3.1	<i>Das transkriptionelle Profil von metastasierten HBs unterscheidet sich von Standard-HBs</i>	55

4.3.2	<i>SP8 ist ein überexprimierter Faktor in metastasierten HBs mit schlechter Prognose und korreliert mit FGF8</i>	57
4.3.3	<i>SP8 fördert die Motilität, Invasion und Selbsterneuerungskapazität von Hep3B-Pool-Zellen</i>	58
4.3.4	<i>Hep3B-Zellen durchlaufen den Prozess der EMT nach Langzeit-SP8-Induktion</i> .	59
4.3.5	<i>FGF8 ist ein essentieller Faktor des SP8-vermittelten, aggressiven Tumorphänotyps</i>	61
4.3.6	<i>Der SP8-vermittelte aggressive Tumorphänotyp als generelles Phänomen in Lebertumorzellen</i>	63
4.3.7	<i>Inhibition der SP-Transkriptionsfaktorfamilie als potentielle neue Behandlungsstrategie von aggressiven HBs</i>	67
5	DISKUSSION	68
5.1	MULTIOMICS-ANSATZ DEFINIERT ZWEI MOLEKULARE SUBGRUPPEN DES HBs	68
5.2	DIE AKTIVIERUNG VON TRIM71 IN EPIGENETISCHER HB-SUBGRUPPE UND SEINE ASSOZIATIONEN MIT DEM WNT-SIGNALWEG	71
5.3	DIE AKTIVIERUNG DER SP8-FGF8-ACHSE IN METASTASIIERTEN HBs	73
5.4	MICRORNAs ALS PROGNOTISCHE BIOMARKER.....	75
5.5	KLINISCHE IMPLIKATIONEN UND AUSBLICK.....	77
6	REFERENZEN	80
7	VERZEICHNISSE	90
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	90
7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	94
7.3	TABELLENVERZEICHNIS.....	95
8	ANHANG	96
9	PUBLIKATIONEN	103
10	DANKSAGUNG	104

ZUSAMMENFASSUNG

Das Hepatoblastom (HB) ist der häufigste maligne Lebertumor im Kindesalter. Seine Entstehung geht auf unreife LeberVorläuferzellen zurück, die eine abnormale Aktivierung von Genen der Embryonalentwicklung und Zelldifferenzierung aufweisen. Generell wird das HB mit einer guten Prognose assoziiert, welche sich allerdings bei gleichzeitiger Manifestation ungünstiger Charakteristika wie fortgeschrittenem Tumorstadium, multifokalem Wachstum oder Metastasierung deutlich verschlechtert. Die molekularen Mechanismen, die einen aggressiveren Tumorphänotyp bedingen, sind bis dato unklar.

Die Analyse des Methyloms von 40 pädiatrischen Primärtumoren der Leber bestehend aus 28 Hepatoblastomen, 6 hepatozellulären Karzinomen, 3 fibrolamellären hepatozellulären Karzinomen und 3 Rhabdoidtumoren der Leber ergab zwei deutliche epigenetische Subgruppen (G1 und G2), in die sich die vier Lebertumorentitäten einfügten. Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich ihrer globalen Methylierungsmuster, differentiell methylierten Regionen, Kopienzahlveränderungen und ihrer klinischen Relevanz legten detaillierte Charakteristika der Subgruppen offen. Während G1-Tumoren in diesen Kategorien starke Ähnlichkeit zu Normalleber-Proben zeigten, waren G2-Tumoren von einer globalen Hypomethylierung mit CpG-Insel-Hypermethylierung, globaler Instabilität und für das HB durch Assoziationen mit dem unreifen proliferativen C2-Subtyp der 16-Gen-Signatur sowie ungünstigen klinischen Parametern wie Multifokalität, Metastasierung und Wnt-Signalwegsmutationen geprägt.

Eine simultane Transkriptomstudie an 11 HB-Proben bestätigte die Präsenz zweier Subgruppen und ihre klinischen Assoziationen, und verdeutlichte insbesondere durch die Inaktivierung zahlreicher Tumorsuppressorgene ein starkes Zusammenspiel von Methylom und Transkriptom. Die Überlagerung beider Datensätze legte mit TRIM71 ein neues potentiell Onkogen in G2-HBs offen, das in *in vitro*-Experimenten eine gesteigerte Zellproliferationsrate und Selbsterneuerungsfähigkeit bedingte. Eine mögliche Beeinflussung der Wnt-Signalwegsaktivierung konnte in HUH6-Zellen bestätigt werden, lieferte für die beobachteten Effekte auf HepT1-, Hep3B- und HUH7-Zellen jedoch keine Erklärung. Eine umfassende Analyse koexprimierter Faktoren deutete weiterhin auf eine wichtige Rolle von TRIM71 im sich selbstverstärkenden Netzwerk LIN28B-HMGA2-IGF2BP1/3 hin.

Durch Expressionsstudien wurde weiterhin das Risikostratifizierungspotential der vier-miR-Signatur (let7a, miR-100, miR-371 und miR-373) in einer unabhängigen Patientenkohorte von 29 HB- und 10 Normalleber-Proben evaluiert. Das zuvor postulierte Risikostratifizierungspotential hinsichtlich des Gesamtüberlebens ließ sich aus unseren Daten

nicht bestätigen und zeigte auch keine Korrelationen mit weiteren Hochrisikoparametern wie Diagnosealter, Tumorstadium, Metastasierung oder multifokalem Wachstum. Die Integration der beiden Transkriptvarianten von miR-483 in die vier-miR-Signatur, deren Expression signifikant mit Gefäßinvasion und Tumorstadium assoziiert war, führte zu einer Optimierung der Gruppenallokation und machte in der Folge eine signifikante Patientendiskriminierung mit guter und schlechter Prognose möglich.

Der Vergleich von Transkriptionsprofilen metastasierter und nicht-metastasierter HBs identifizierte den Transkriptionsfaktor *SP8* und den Wachstumsfaktor *FGF8* als die am stärksten hochregulierten Faktoren in metastasierten Tumoren, die neben der Metastasierung auch mit dem C2-Subtyp der 16-Gen-Signatur und einer deutlich schlechteren Prognose in Verbindung standen. Die Analyse zugehöriger Methylierungsdaten legte zudem eine Demethylierung der jeweiligen Promotorregion offen. Die Anwendung der Chromatin-Immunpräzipitation deutete auf eine direkte transkriptionelle Kontrolle von *FGF8* durch die Bindung von *SP8* an den *FGF8*-Promotor hin. *In vitro*-Experimente wiesen eine verstärkende Wirkung von *SP8* auf die Zellmotilität, Selbsterneuerung, Migration und Invasion in HB-Zellen nach und bestätigten das onkogene Potential von *SP8*. Langzeitexpressionsstudien von *SP8* in stabil transfizierten Hep3B-Zellen manifestierten zudem eine Akquisition des mesenchymalen Phänotyps und die Hochregulation zahlreicher Gene, die die epitheliale-mesenchymale Transition anregen. *Rescue*-Experimente durch *CRISPR interference*-vermittelten Knock-down von *FGF8* belegten die essentielle Rolle von *FGF8* für den *SP8*-aktivierten aggressiven Tumorphänotyp. Die Behandlung von Hepatomzelllinien mit dem pan SP-Transkriptionsfaktorinhibitor Mithramycin A resultierte in einer signifikanten Inhibition des klonogenen Wachstums.

Zusammenfassend konnten durch die fundierte Analyse des Methyloms und Transkriptoms mit *TRIM71*, *miR-483*, *SP8* und *FGF8* neue, potentiell onkogene Kandidaten offengelegt werden, die durch ihre Assoziationen mit Hochrisiko-Parametern neue molekulare Mechanismen der HB-Progression aufzeigten und zukünftig als prognostische Biomarker genutzt werden könnten.

ABSTRACT

Hepatoblastoma (HB) is the most common malignant liver tumor during childhood. Its development is based on immature liver precursor cells, which show an abnormal activation of embryonic developmental genes and cell differentiation genes. In general, HB is associated with a good prognosis, however, if a simultaneous manifestation of unfavorable characteristics such as advanced tumor stage, multifocal growth or metastasis can be observed, prognosis is still poor. The molecular mechanisms that lead to a more aggressive tumor phenotype are still unclear.

The analysis of the methylome of 40 primary childhood liver tumors consisting of 28 hepatoblastomas, 6 hepatocellular carcinomas, 3 fibrolamellar hepatocellular carcinomas and 3 rhabdoid tumors of the liver revealed that the four liver tumor entities clustered in two distinct epigenetic subgroups (G1 and G2). Further investigations with regard to their global methylation patterns, differentially methylated regions, changes in copy numbers and their clinical relevance uncovered detailed characteristics of the subgroups. While G1 tumors showed strong similarity to normal liver samples in these categories, G2 tumors were affected by global hypomethylation with CpG island hypermethylation, global instability, and for HBs by associations with the immature proliferative C2 subtype of the 16-gene signature as well as by unfavorable clinical parameters such as multifocality, metastasis and Wnt signaling pathway mutations.

A simultaneous transcriptomic study on 11 HB samples confirmed the presence of two subgroups and their clinical associations, and demonstrated in particular by the inactivation of numerous tumor suppressor genes the strong interplay between methylome and transcriptome. The overlay of both data sets revealed TRIM71 as a new potential oncogene in G2-HBs, whose overexpression positively affected cell proliferation rate and self-renewal ability as stated by *in vitro* experiments. A possible influence on the Wnt signaling pathway activation could be confirmed in HUH6 cells, but did not provide any explanation for the observed effects on HepT1, Hep3B and HUH7 cells. A comprehensive analysis of coexpressed factors further indicated an important role of TRIM71 in the self-reinforcing network LIN28B-HMGA2-IGF2BP1/3.

Additional expression studies also evaluated the risk stratification potential of the four-miR-signature (let7a, miR-100, miR-371 and miR-373) in an independent patient cohort of 29 HB and 10 normal liver samples. The previously postulated risk stratification potential concerning overall survival could not be confirmed by our data and did not present any correlations with other high-risk parameters such as age at diagnosis, tumor stage, metastasis or multifocal growth. The integration of the two transcript variants of miR-483 into the four-miR-signature, whose expression was significantly associated with vascular invasion and tumor stage, led to an

optimization of the group allocation and subsequently allowed significant patient discrimination in a good and poor prognostic group.

The comparison of transcriptional profiles of metastatic and non-metastatic HBs identified the transcription factor *SP8* and the growth factor *FGF8* as the most highly upregulated factors in metastatic tumors, which could be associated with the C2 subtype of the 16-gene signature and poor survival. Analysis of related methylation data also revealed demethylation of the respective promoter region. Chromatin immunoprecipitation indicated direct transcriptional control of *FGF8* by the binding of *SP8* to the *FGF8* promoter. *In vitro* experiments demonstrated promoting effects of *SP8* on cell motility, self-renewal, migration and invasion in HB cells and confirmed the oncogenic potential of *SP8*. Long-term expression studies of *SP8* in stable transfected Hep3B cells also manifested the acquisition of a mesenchymal phenotype and a strong upregulation of numerous genes linked to epithelial-mesenchymal transition. Rescue experiments by CRISPR interference-mediated knock-down of *FGF8* proved the essential role of *FGF8* for the *SP8*-activated aggressive tumor phenotype. Treatment of hepatoma cell lines with the pan SP transcription factor inhibitor mithramycin A resulted in a significant inhibition of clonogenic growth.

In summary, in-depth analysis of the methylome and transcriptome and their associations with high-risk parameters uncovered *TRIM71*, *miR-483*, *SP8* and *FGF8* as potentially new oncogenic candidates, which led to the identification of novel molecular mechanisms in HB progression and might serve as prognostic biomarkers in the future.

1 EINLEITUNG

Der Begriff „solider Tumor“ definiert eine feste, örtlich umschriebene Geschwulst aus körpereigenem Gewebe, welche aus den verschiedensten Organen hervorgehen kann und benigne oder maligne Charakteristika aufweist. Solide Tumore im Kindesalter sind dabei klar von den Tumoren Erwachsener abzugrenzen und unterscheiden sich deutlich in wichtigen Aspekten, wie der Epidemiologie, den Behandlungsoptionen und der Prognose, sowie auch in der Tumorbiologie. Während die maligne Transformation bei Erwachsenen vereinfacht als kummulative Anhäufung von Mutationen festzuhalten ist, die den Verlust von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung von Onkogenen bedingen¹, ist die Mutationsrate bei Kindern um ein Vielfaches geringer² und eher als sehr seltene, aber unglückliche Konsequenz fehlgesteuerter Wachstums- und Differenzierungsprozesse zu sehen³. Besonders zutreffend ist dies für eine Untergruppe pädiatrischer Krebsarten, den embryonalen Tumoren, die aus unreifen Zellpopulationen entstehen, die den Prozess der terminalen Differenzierung während der fetalen oder postnatalen Entwicklung nicht abschließen konnten³, und sich damit durch ihre embryonalen Eigenschaften und ihre sehr frühe Manifestation charakterisieren lassen⁴. Die häufigsten Formen embryonaler Tumoren sortiert nach ihrer Prävalenz sind Neuroblastome, Rhabdomyosarkome, Wilmstumoren, Retinoblastome und Hepatoblastome und stellen damit insgesamt circa 20% der Krebserkrankungen in Kindern unter 15 Jahren dar.⁵ Die Überlebenschancen konnten dabei seit den 1980er Jahren von 67% auf 85% deutlich gesteigert werden.⁵ Dennoch stellt Krebs weiterhin die zweithäufigste Todesursache bei Kindern zwischen 0 und 15 Jahren dar⁵, was weitere Fortschritte in der Identifizierung neuer Behandlungsoptionen und in der Individualisierung von Therapiemaßnahmen notwendig macht. Die Forschungstätigkeit meiner Dissertation widmete sich dem Hepatoblastom, welches ich daher im Folgenden näher erläutern möchte.

1.1 Hepatoblastom

1.1.1 Epidemiologie und klinische Aspekte

Das Hepatoblastom (HB) ist der häufigste kindliche Lebertumor, der sich meist während der ersten drei Lebensjahre manifestiert und für etwa 1% der pädiatrischen Tumorerkrankungen verantwortlich ist.⁶⁻⁷ Die Inzidenz beträgt 1,5 pro 1.000.000 und zeichnete in den letzten 30 Jahren einen leicht steigenden Trend ab.⁸ Der Großteil der HBs tritt sporadisch auf, während etwa 15% aller Fälle mit genetischen Prädispositionen assoziiert werden.⁹ Insbesondere Patienten mit Familiärer Adenomatöser Polyposis (FAP), welche durch eine Keimbahnmutation im *APC*-Gen verursacht wird, haben ein 0,42%iges-Risiko ein HB zu entwickeln.¹⁰ Auch das Beckwith-Wiedemann-Syndrom wird mit der Entwicklung embryonaler Tumore in Verbindung

1 EINLEITUNG

gebracht¹¹⁻¹² und steigert das Risiko eines HBs um das zwei- bis dreifache¹³. Der zugrundeliegende molekulare Defekt basiert dabei in vielen Fällen auf einer fehlerhaften Prägung des *IGF2-H19*-Lokus auf Chromosom 11p15.5,¹³ bei welchem durch Hypermethylierung der differentiell methylierten Region von *H19* der abschirmende Effekt des Insulators CTCF auf die Enhancerregion ausbleibt und somit die biallele Expression von *IGF2* bedingt.¹⁴ Des Weiteren stehen ein geringes Geburtsgewicht, Präeklampsie und parentaler Tabakkonsum mit einem erhöhten Risiko im Zusammenhang.¹⁵⁻¹⁶

Die Entstehung des HBs geht von primitiven Leberstammzellen (Hepatoblasten) aus, die häufig die Phasen der Leberzellendifferenzierung rekapituliert.¹⁷ Bei der Betrachtung der Histopathologie kann das HB daher sehr variabel auftreten und klassifiziert sich primär in eine „epitheliale“ und eine „gemischt epitheliale/ mesenchymale“ Kategorie, abhängig von der Zusammensetzung der Komponenten, Zelltypen und Wachstumsmuster.¹⁸⁻¹⁹ In der epithelialen Kategorie differenziert man weiterhin die fünf Subgruppen „fetal“, „embryonal“, „makrotrabekular“, „kleinzellig- undifferenziert“ und „cholangioblastisch“. Die Einteilung der gemischten Subgruppe erfolgt in „stromale“ und „teratoide“ Bestandteile.⁸

Im Patienten präsentiert sich das HB meist als eine schnell-wachsende, leicht schmerzende, abdominale Zellmasse, die zu 55-60% der Fälle im rechten Leberlappen entsteht.²⁰ Einige Fälle gehen dabei mit unspezifischen Symptomen wie Gewichtsverlust, Gedeihstörungen oder Appetitlosigkeit einher, während in 90% der Patienten erhöhte Werte des Alpha-Fetoproteins (AFP) gefunden werden.²¹

Die Tumorsektion bildet zusammen mit neoadjuvanter bzw. adjuvanter Chemotherapie, abhängig von der Resizierbarkeit des Tumors, den Grundstein der Behandlung. Die Chemotherapie basiert dabei generell auf platinhaltigen Agenzien, wie Cisplatin oder Carboplatin. Hochrisikopatienten können zusätzlich mit Doxorubicin behandelt werden.²² Bildgebende Verfahren wie Ultraschall, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie helfen bei der Abschätzung des involvierten Leberanteils, bei der präoperativen Planung, sowie bei der Detektion von Metastasen.²³ Bleibt der Tumor nicht-resizierbar, kann eine Lebertransplantation in Frage kommen.

Die stetige Verbesserung der Behandlungsstrategien hat die Prognose der Patienten in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert und weist bei Standardrisikopatienten eine Dreijahresüberlebensrate von 95% auf.²² Jedoch liegt die Überlebensrate bei Hochrisikopatienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium, Gefäßinvasion und dem Auftreten von Metastasen trotz aggressiver Behandlung bei unter 70%.^{22, 24}

1.1.2 Genetische Veränderungen

Neben der Histologie weist das HB genomische Veränderungen auf, die für eine weiterführende Charakterisierung nützlich sind.

Zytogenetische Veränderungen treten dabei sehr häufig im HB auf und betreffen in den meisten Fällen die Chromosomen 2, 8 und 20 durch einen Zugewinn und die Chromosomen 4 und 18 durch einen Verlust.^{8, 25} Damit im Zusammenhang stehend ist es bisher ungeklärt, ob die HB-Tumorgenese die Folge oder die Ursache der Aneuploidie darstellt.²⁶⁻²⁷ Auch wiederkehrende chromosomale Translokationen wie (4)t(1;4)(q12;q34)²⁸ oder 2q24²⁹ wurden in mehreren HB-Fällen beschrieben.

Die Genmutationsrate bei kindlichen Tumoren ist im Mittel sehr niedrig und im Vergleich zu Erwachsenen Tumoren um das 14-fache geringer.² Dies gilt insbesondere für das HB, für welches eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass es mit etwa 4 Mutationen pro Tumor die niedrigste Mutationsrate im Vergleich zu allen pädiatrischen Entitäten aufweist.²

Davon am häufigsten betroffen ist das *CTNNB1*-Gen, welches in bis zu 90% der HB-Fälle mutiert ist.³⁰⁻³² *CTNNB1* codiert für das Protein β -Catenin, welches neben wichtigen Funktionen in der Zelladhäsion und -kommunikation³³ eine Hauptkomponente des Wnt-Signalweges darstellt³⁴. Der Wnt-Signalweg spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung. Durch entsprechende *CTNNB1*-Mutationen wird eine unkontrollierte Aktivität des Wnt-Signalweges bedingt, indem β -Catenin nicht mehr abgebaut wird, akkumuliert und die Expression von Zielgenen im Nukleus initiiert.

Neben *CTNNB1* wurde auch von weiteren Gen-Mutationen des Wnt-Signalweges im HB berichtet, die den Abbau von β -Catenin steuern und damit zu einer ähnlichen Aktivierung des Signalweges führen.²⁵ Darunter fand man *APC*-Mutationen, die wie zuvor erwähnt entweder als Keimbahnmutation im Zusammenhang mit FAP oder als somatische Mutation auftreten können.³⁵ Aber auch Fälle mit *AXIN1*- und *AXIN2*-Mutationen wurden in einigen HB-Patienten gefunden.³⁶⁻³⁷

In vereinzelt Tumoren zeigten sich auch Punktmutationen im *PIK3CA*-Gen, welches für die Phosphatidylinositol-3-Kinase codiert,³⁸ Amplifikationen des verwandten *PIK3C2B*-Gens,³⁹ sowie des *PLAG1*-Gens, welches einen positiven Regulator des Wachstumsfaktors IGF2 codiert.⁴⁰ Eine weitere Studie zur Untersuchung von 15 HB-Fällen fand neben der hohen Prävalenz von *CTNNB1*-Mutationen (80%), Deletionen in *RAD17* und *TP53*, sowie *TERT*-Promotormutationen. Auch zwei neue Fälle von *NFE2L2*-Mutationen, welche eine Überexpression des gleichnamigen Proteins zur Folge haben und mit Gefäßinvasion und Metastasierung in Verbindung gebracht werden konnten, wurden identifiziert.³¹

1.1.3 Deregulierte Transkriptionsprofile im HB

Die Optimierung der Hochdurchsatz-Sequenzieretechnologien hinsichtlich Kosten und Geschwindigkeit hat in den letzten 20 Jahren massiv dazu beigetragen, dass durch umfassende Analysen die globalen Genexpressionsmuster im HB studiert und neue deregulierte Gene, die in die Entwicklung und Progression involviert sind, aufgedeckt werden konnten.

Eine große Gruppe machten hierbei die geprägten Gene aus, die durch selektive Stilllegung eines parentalen Allels mittels DNA-Methylierung, in der Regel lediglich das andere Allel exprimieren. *IGF2*, welches im Zusammenhang mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom steht, gilt als das am häufigsten überexprimierte Gen im HB⁴¹⁻⁴², und wurde auch in anderen pädiatrischen Tumoren wie dem Wilmstumor oder dem Rhabdomyosarkom als überexprimierter Faktor detektiert.⁴³ Weitere überexprimierte, geprägte Gene sind *DLK1*^{30, 32, 44}, *PEG3*³⁰, *PEG10*⁴⁴, *MEG3*³⁰ und *NDN*⁶⁰, welche ebenso im Wilmstumor gefunden werden konnten⁴⁵⁻⁴⁶. Erstaunlicherweise konnte im Zusammenhang mit *DLK1* eine erst kürzlich veröffentlichte Studie von Carrillo-Reixach et al. zeigen, dass der gesamte onkogene Locus *DLK1-DIO3* auf Chromosom 14q32 eine Überexpression darauf befindlicher Gene aufweist, die mit veränderter DNA-Methylierung einhergeht und eine ungünstige Prognose für HB-Patienten charakterisiert.⁴⁷ Auch Rumbajan et al. stellten fest, dass sich geprägte Loci durch eine veränderte DNA-Methylierung im HB kennzeichnen.⁴⁸ Ein weiteres Spektrum konstant hochregulierter Gene betrifft eine Vielzahl an Wnt-Signalwegs-Regulatoren und -Effektoren sowie Targets wie *AXIN2*, *GPC3*, *LEF1*, *DVL2*, und *DVL3*, die Wnt-Antagonisten *DKK1*, *DKK3* und *DKK4*, sowie die Stammzellmarker *LGR5* und *TBX3*, die unabhängig vom histologischen Subtyp detektiert werden können und somit eher ein grundlegendes und frühes Ereignis in der Tumorgenese des HBs darstellen.^{30, 49} Ähnliches gilt auch für Zellzyklus-Gene, die eine weitere Klasse an deregulierten Genen bilden, wobei unter anderem die Überexpression von *BUB1*³⁰, *E2F5*³⁰, *DLG7*³⁰, *AURKB*³⁰, *TOP2A*⁵⁰ und *PLK1*⁵¹ als allgemeines Phänomen im HB festgehalten werden konnte. Cairo et al. und Sumazin et al. berichteten zudem von der Herunterregulation der let7-microRNA-Familie, die durch die Regulation mehrerer Onkogene als Tumorsuppressoren agieren und mit ungünstigem Krankheitsverlauf im HB korreliert werden konnten.^{32, 52} Interessanterweise identifizierten weitere Studien bekannte onkogene Interaktoren und Targets von let7 wie *LIN28B*^{32, 53}, *HMGA2*^{32, 50} oder *TRIM71*⁵⁰ als hochregulierte Faktoren in prognostischen Subgruppen des HBs und legen somit die Vermutung offen, dass das let7-Netzwerk eine entscheidende Rolle in der HB-Tumorprogression spielt.

1.1.4 Risikostratifizierung anhand klinischer Parameter

Die Identifizierung zuverlässiger prognostischer Faktoren zur Entwicklung optimaler, individuell-zugeschnittener Behandlungsstrategien kann sich insbesondere bei sehr seltenen Tumoren, wie

dem HB, aufgrund der geringen Anzahl an Patienten pro Jahr als sehr schwierig gestalten. Neben der Bestimmung der AFP-Werte, sind es bisher hauptsächlich klinische Aspekte, die mit der Risikostratifizierung assoziiert werden.

Eine wichtige Säule bildet dabei die Tumorstadienbestimmung nach PRETEXT (*pretreatment extent of disease*), welche auf die Erfassung der Ausdehnung des Tumors auf die vier Hauptsegmente der Leber, rechtes posteriores Segment (Couinaud 6,7), rechtes anteriores Segment (Couinaud 5,8), linkes mediales Segment (Couinaud 4a und 4b) und linkes laterales Segment (Couinaud 2, 3) abzielt. Die Zuordnung zu einer der vier PRETEXT-Gruppen (PRETEXT I, II, III oder IV) bestimmt sich durch die Zahl der involvierten Lebersegmente (Abb. 1). Eine zusätzliche Annotation erfolgt mit „V“ für „Befall der Vena cava“, „P“ für „Befall des Pfortadersystems“, „E“ für „extrahepatische Ausweitung des Tumors“, und „M“ für „Metastasierung in entfernte Organe“, um die entsprechende Tumorausweitung außerhalb des Leberparenchyms zu kennzeichnen, sowie „C“ für „Befall des kleinen Leberlappens lobus caudatus“.⁵⁴

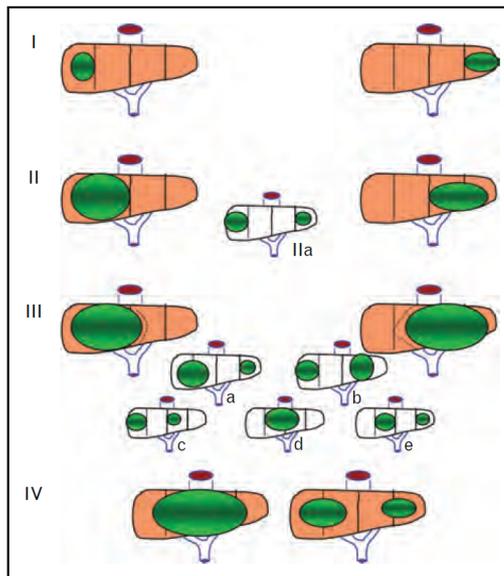


Abbildung 1: Tumor-Stadienbestimmung nach PRETEXT.⁵⁴

Abgesehen von der PRETEXT-Bestimmung erfolgte die Risikostratifizierung in den vier großen Studiengruppen *Children's Oncology Group (COG)*, *International Childhood Liver Tumors Strategy Group (SIOPEL)*, *German Society for Pediatric Oncology (GPOH)* und *Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumors (JPLT)* nach unterschiedlichen Parametern und erschwerte lange Jahre die Ermittlung verlässlicher prognostischer Faktoren. Eine gute Prognose laut SIOPEL ging demnach mit einem niedrigen PRETEXT-Stadium einher (I-III)⁵⁵, während COG eine gute Prognose für PRETEXT I und Tumoren mit purer, fetaler Histologie aufzeigte⁵⁶⁻⁵⁷. Die

unabhängige Bestimmung negativ prognostischer Faktoren führte insbesondere zu PRETEXT IV, Metastasierung, AFP < 100 ng/ml und einer kleinzellig-undifferenzierten-Histologie.⁵⁸⁻⁵⁹ Um in der Zukunft eine verbesserte und strukturiertere Risikostratifizierung zu gewähren, trat 2016 die *Children's Hepatic tumors International Collaboration* mit dem Ziel zusammen, ein einheitliches Stratifizierungssystem basierend auf globalen HB-Daten zu erarbeiten. Hierfür wurden insgesamt 1605 HB-Fälle aus den 4 Studiengruppen gesammelt und hinsichtlich ihrer klinischen Daten analysiert.⁶⁰ Die multivariate Datenanalyse ergab signifikante Werte für PRETEXT, AFP < 100 ng/ml, AFP von 100-1000 ng/ml, Alter > 8 Jahre, +V, +P, +E, Multifokalität und Metastasierung.⁶⁰ Insbesondere die Metastasierung stach als Hauptrisikoparameter heraus, da sie unabhängig vom PRETEXT-Stadium in jedem positiven Fall eine Klassifizierung zum Hochrisiko-HB bedingte⁶¹. Aufgrund ihrer prognostischen Tragweite und Relevanz für diese Arbeit soll sie nachfolgend näher erläutert werden.

1.1.5 Metastasierung

Metastasierung gilt als die Hauptursache für tumorbedingte Sterblichkeit und ist für etwa 90% der Todesfälle verantwortlich.⁶² Auch in kindlichen Lebertumoren geht Metastasierung mit einer deutlich schlechteren Prognose einher und lässt die 3-Jahresüberlebenschancen auf 49% sinken.⁶³ Die Streuung von Krebszellen ausgehend vom Primärtumor und die darauffolgende Ansiedelung von neuen Tumorkolonien in entfernte Gewebe ist ein mehrstufiger, komplexer Prozess, der als „Invasions-Metastasierungskaskade“ bekannt ist und Schätzungen zufolge lediglich für 0,01% der Tumorzellen, die den Blutstrom erreichen, in einer klinisch detektierbaren Metastase mündet⁶⁴.

Zu den dafür notwendigen Ereignissen gehören die lokale Invasion des Primärtumors in das umliegende Gewebe (1), Intravasation dieser Zellen in den Blutkreislauf (2) und Zellüberleben im Blutstrom (3), Festsetzung an (4) und Extravasation (5) durch die Blutgefäßwand in das Parenchym des neuen Gewebes, Bildung von Mikrometastasen (6) und letztlich Koloniebildung durch Zellproliferation (7) bis eine klinische Detektion der Metastase (8) erfolgen kann (Abb. 2).⁶⁵

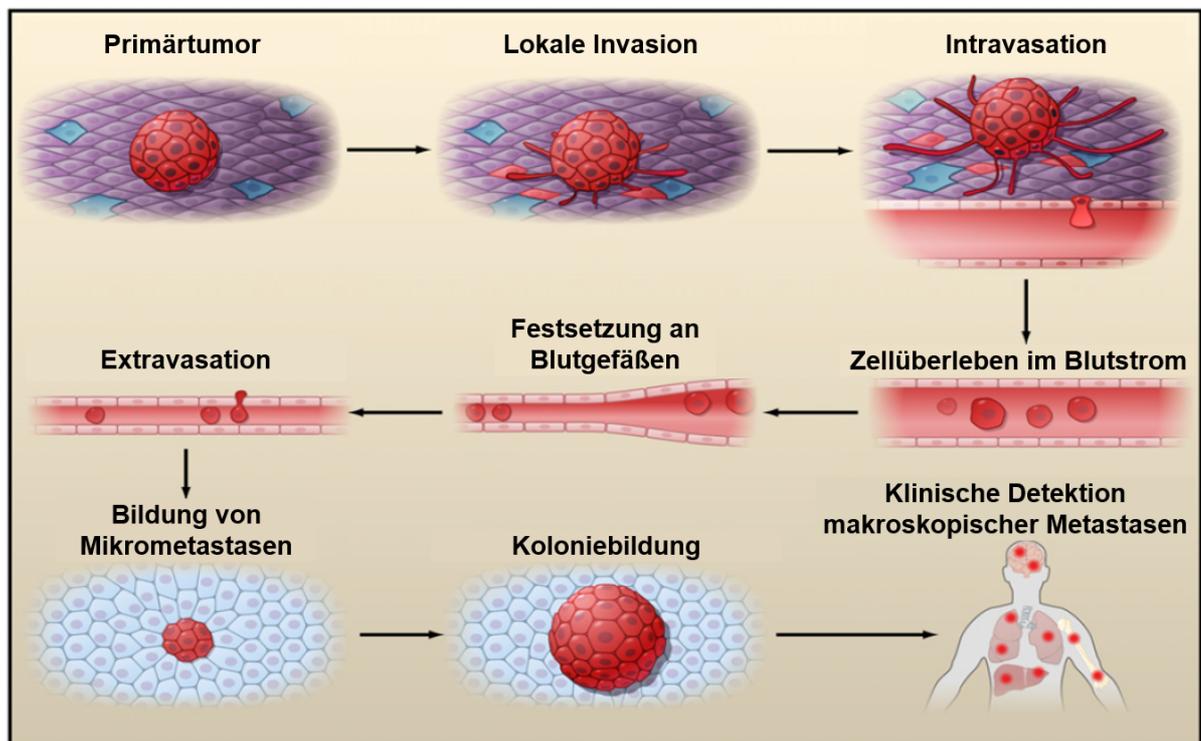


Abbildung 2: Die Invasions-Metastasierungskaskade. Klinisch detektierbare Metastasen stellen das Resultat einer komplexen Serie von zellbiologischen Ereignissen dar, die zusammenfassend als Invasions-Metastasierungskaskade bezeichnet werden. Während des Prozesses erfolgt das Abscheiden von Tumorzellen aus der Lokalisation des Primärtumors, eine systematische Translokation und letztlich eine Adaption der Tumorzellen an die Mikroumgebung neuer Gewebe. Adaptiert von ⁶⁶.

Neben einer Vielzahl an zellbiologischen Vorgängen, die in die Invasions-Metastasierungskaskade verstrickt sind, wie Tumor-Tumor- und Tumor-extrazelluläre Matrix-(EZM)-Adhäsions-Moleküle, diverse Proteasen, Adhäsionsmechanismen zum Endothel der Blutgefäße, vermittelt besonders der Prozess der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) die notwendigen Plastizitäts-, Stammzell- und tumorinitiierenden Signalwege.⁶⁷

Die EMT zusammen mit seinem reversen Prozess der mesenchymalen-epithelialen Transition stellt eine unverzichtbare Eigenschaft für viele physiologische Vorgänge wie der Embryogenese oder Gewebhomeostase dar, ist damit jedoch auch in pathologische Prozesse, wie Fibrose oder Krebs involviert.⁶⁸ EMT umschreibt die graduelle Umstrukturierung der epithelialen Zellarchitektur und seiner funktionellen Charakteristika hin zu einem mesenchymalen Zellphänotyp. Sie verläuft schrittweise und beginnt mit dem Verlust der apikal-basalen Zellpolarität aufgrund der Auflösung von *Tight-Junctions*, der Auftrennung von epithelialen Zell-Zell-Verbindungen und der Zerstörung der Basalmembran.⁶⁹⁻⁷⁰ Zelloberflächenproteine wie E-Cadherin und Integrine, die für die Konnektivität von Epithelzellen und für die Verbindung zur Basalmembran verantwortlich sind, werden durch N-Cadherin und andere Integrine, die eher transient-adhäsive Eigenschaften vermitteln, ersetzt und bereiten die Zellen für die Übernahme des mesenchymalen Zellphänotyps vor.⁷¹ Auch eine Umstrukturierung des Zytoskeletts findet

statt und ermöglicht den Zellen die nötige Motilität, um sich durch die dreidimensionale extrazelluläre Matrix zu bewegen. Insbesondere die Struktur des Aktin-Zytoskeletts unterliegt dynamischen Änderungen und verlagert sich von einem stabilen äußeren Netzwerk als Stressfasern in die Zellausläufer. Ebenso werden die epithelialen Intermediärfilamente aus Zytokeratinen durch Vimentin ersetzt⁷² und erlauben in der Summe einen Übergang von einer kubischen zu einer spindelförmigen Zellgestalt, die eine verstärkte Motilität und Invasivität, sowie die Fähigkeit zum Abbau der extrazellulären Matrix aufweist.

Während die Aktivierung der EMT die Invasion und Streuung von Tumorzellen ((1) – (2)) bedingt, unterstützt der umgekehrte Vorgang der mesenchymalen-epithelialen Transition eher die Bildung der Mikrometastasen und die Koloniebildung ((6) – (7)).^{69, 73-74} Die Akquisition von Selbsterneuerungseigenschaften, die mit Stammzellen und Krebsstammzellen assoziiert werden, stellt hierfür ebenso einen wichtigen Schritt dar.⁷⁵

Eine Vielzahl an extrazellulären Signalen können zur Initiation und zur Modulation des EMT-Prozesses beitragen. Dazu zählen klassische Wachstumsfaktoren, die von Tumorzellen oder von Zellen des Tumorstromas sezerniert werden, aktive Signalwege wie Wnt, Notch, Hedgehog, JAK-STAT, AP-1, NF-κB oder Hippo, sowie metabolischer und mechanischer Stress, Hypoxie oder Matrixversteifung.^{69, 74, 76} Die Mehrheit dieser Signale und Prozesse bündelt sich auf der Ebene der EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren.⁷⁷ Die Transkriptionsfaktorfamilien Snail (bestehend aus Snail und Slug), Zeb (bestehend aus Zeb1 und Zeb2) und Twist (bestehend aus E12, E47, Twist1, Twist2, und Id) spielen dabei eine zentrale Rolle in der entwicklungsbedingten und onkogenen EMT und werden als Master-EMT-Transkriptionsfaktoren angesehen.⁷⁸ Sie gewähren eine effiziente Einleitung der epithelialen Zell-Dedifferenzierung, indem sie als transkriptioneller Repressor von epithelialen Genen wie E-Cadherin und als transkriptioneller Aktivator von mesenchymalen Genen wie N-Cadherin agieren.^{76, 78} Auch für weitere Transkriptionsfaktoren konnte ein Zusammenhang mit der EMT beschrieben werden, darunter findet man u.a. Sox4⁷⁹ und Sox9⁸⁰, Klf4⁸¹, FoxC2⁸², AP-1⁸³ und Tead2⁸⁴. Einen wichtigen Regulationsmechanismus stellt die reziproke, negative Rückkopplung von microRNAs (miRs) und Master-EMT-Transkriptionsfaktoren dar, die als molekulare Schalter fungieren und die Feinjustierung und Umkehrbarkeit der EMT und damit der epithelialen/ mesenchymalen Zellplastizität steuern.⁸⁵⁻⁸⁷ Beispielsweise werden miRs der miR-200-Familie mit dem epithelialen Zelltyp in Verbindung gebracht, zeigen einen Expressionsrückgang nach EMT-Induktion und verhindern den EMT-Prozess, indem sie als posttranskriptionelle Repressoren von Zeb1 und Zeb2 agieren.⁸⁸⁻⁹² Umgekehrt binden Zeb1 und Zeb2 direkt an die Promotoren der miR-200-Familie, unterdrücken deren Expression und steuern dadurch die Zellmigration und -invasion.^{85, 93}

Im Kontext von HB konnten bis dato nur wenige Faktoren, die zur Metastasierung und EMT-Aktivierung im HB führen, aufgezeigt werden. Eine Veröffentlichung von Zucchini-Pascal et al. beispielsweise manifestierte ein komplexes Netzwerk aus ERK1/2, Snail und dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-behandelten HepG2-Zellen, welches einen starken EMT-Prozess durch Änderung des Zellphänotyps und des Expressionsprofils von epithelialen und mesenchymalen Markern bedingt.⁹⁴ Andere Studien konnten für Perostin⁹⁵ und Thymosin β 4⁹⁶ einen EMT-fördernden und für DRAM1⁹⁷ einen EMT-hindernden Effekt nachweisen.

Weitere Studien sind daher dringend notwendig, um fundierteres Wissen und neue Erkenntnisse über die Vorgänge während der Metastasierung und EMT im HB zu gewinnen.

1.1.6 Molekulare Marker im HB

Neben den klinischen Parametern können auch molekulare Marker einen wichtigen Beitrag zur Risikostratifizierung leisten und das individuelle Management von Krebspatienten unterstützen. Auf Ein- oder Mehr-Gen- beziehungsweise miR-Signaturen basierende Assays bestimmen dabei die Deregulation in spezifischen Signalwegen und lenken damit als prädiktive Biomarker die Therapieentscheidung.

Die Identifikation klinisch relevanter Biomarker für das HB hat sich allerdings in der Vergangenheit als eher ernüchternd erwiesen. Der einzige Biomarker, der derzeit unter klinischer Anwendung steht und zur Beurteilung des Therapieansprechens und zur Detektion von Rezidiven zum Einsatz kommt, ist das AFP, dessen Gehalt im Blutplasma bestimmt wird. AFP ist ein Glykoprotein, welches normalerweise während der Gestation vom Dottersack der fetalen Leber bzw. von Lebertumorzellen exprimiert wird und erstmalig 1956 in einem Fötus entdeckt wurde.⁹⁸ Es stellt ein fetales Transportprotein dar, welches strukturell eng verwandt mit Albumin ist und circa ab der 4. Schwangerschaftswoche bis zur 10. Lebenswoche nachgewiesen werden kann.⁹⁹ Danach ist der Plasmagehalt mit weniger als 40 ng/ml gewöhnlich sehr niedrig. Ein Anstieg geht in den meisten Fällen mit einer abnormalen Physiologie einher und macht AFP zu einem geeigneten Biomarker für Leber-, Keimzell- und Dottersacktumore.¹⁰⁰ Für das HB konnten vorangegangene Studien den prognostischen Wert von AFP dokumentieren und zeigen, dass insbesondere normale bis geringe AFP-Werte (< 100 ng/ml) sowie AFP-Werte $> 1,2 \times 10^6$ ng/ml eine schlechte Prognose bedeuten⁶³ und mit einem spezifischen histologischen Subtyp verbunden sind¹⁰¹. Zudem erwies sich AFP als verlässlicher Indikator für den Krankheitsverlauf und konnte zur Identifizierung von schlechtem Therapieansprechen, Rezidiven oder Metastasierung herangezogen werden und damit auf eine Anpassung der Behandlungsstrategie aufmerksam machen.¹⁰²

Obwohl sie sich derzeit nicht in der klinischen Anwendung befindet, ist hier auch die in 2008 veröffentlichte 16-Gen-Signatur von Cairo et al. zu erwähnen, dessen molekulare Klassifizierung mit Hilfe des Expressionsprofils von 16 Genen im HB eine ähnlich gute Vorhersage zum Krankheitsverlauf ermöglicht wie eine Stratifizierung nach klinischen Parametern.³⁰

Anhand der Expressionswerte von *CYP2E1*, *ALDH2*, *APCS*, *HPD*, *C1S*, *GHR*, *APOC4*, *AQP9*, *RPL10A*, *E2F5*, *NLE1*, *BUB1*, *DLG7*, *IGSF1*, *AFP* und *DUSP9* erfolgte eine Einteilung in zwei HB-Untergruppen. Die Standardrisiko-Gruppe C1 geht dabei mit einem weniger aggressiven, fetalen Tumorphänotyp und einem günstigeren Krankheitsverlauf einher, während die Hochrisikogruppe C2 als unreife, hochproliferative Tumoren charakterisiert sind, die klinisch mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, Gefäßinvasion, Metastasierung und einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert werden. Weiterhin wurde erst kürzlich die 4-Gen-Signatur veröffentlicht, die auf eine diagnostisch weniger komplexe Stratifizierung und Optimierung der 16-Gen-Signatur abzielte.⁵⁰ Hierbei war die Bestimmung der Expression von *HSD17B6*, *ITGA6*, *TOP2A* und *VIM* bereits ausreichend, um die beiden Gruppen C1 und C2 zu differenzieren, sowie eine feinere Einteilung der C2-Gruppe in eine mittlere Risikogruppe C2B und eine Hochrisiko-Gruppe C2A zu erreichen.⁵⁰

Eine weitere wichtige Pionierstudie zur Entwicklung einer Biomarker-basierten Stratifizierung stellt die Studie von Cairo et al. dar, die an 65 Patienten durchgeführt wurde.⁵² Basierend auf der 16-Gen-Signatur³⁰ ließ sich durch Überlagerung von mRNA- und miR-Expressionsprofilen eine vier-miR-Signatur bestehend aus miR-100, let7a, miR-371 und miR-373 ableiten, die ebenso eine Diskriminierung in zwei HB-Risikogruppen, äquivalent zu C1 und C2 in Cm1 und Cm2 ermöglichte. Letztere konnte ebenso wie die Subgruppe C2 mit einem invasiven und metastasierenden HB und kürzerem Patientenüberleben in Verbindung gebracht werden.⁵² Alle vier miRs dieser Studie werden durch den Transkriptionsfaktor MYC reguliert, welcher einer der essentiellen Faktoren in der HB-Entwicklung darstellt.⁵² Neben diesen vier miRs, sind nur wenige andere miRs beschrieben, denen prognostische Relevanz im HB zukommt. Darunter fallen beispielsweise hohe Expressionswerte von miR-224¹⁰³ und miR-492¹⁰⁴ bzw. geringe Expressionswerte von miR-34a-c¹⁰⁵, die zur Vorhersage eines ungünstigen Krankheitsverlaufes und schlechter Überlebenswahrscheinlichkeit herangezogen werden können. Zu miR-492 sei anzumerken, dass sie aus der codierenden Sequenz von *KRT19*, ebenfalls ein Biomarker für eine schlechte Prognose im HB, abgelesen wird und deren Koexpression besonders in metastasiertem HB auftrat.¹⁰⁴

Ein vielversprechender neuer prognostischer Biomarker ist miR-483, welcher vom zweiten Intron des *IGF2*-Gens auf Chromosomen 11p15.5 transkribiert wird und bereits mit verschiedenen Pathologien inklusive Leberkrebs beschrieben wurde.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ Die Koregulation mit *IGF2* und die transkriptionelle Induktion durch β -Catenin sind mögliche Mechanismen, die die

Hochregulation von miR-483 in verschiedenen Krebsentitäten erklärt.¹¹⁰ Im Wilmstumor wurde miR-483-5p beispielsweise als Teil einer positiven Rückkopplung analysiert, indem sie die mRNA ihres Ursprung-Gens *IGF2* selbst hochreguliert und dabei mit verstärkter Tumorgenese *in vivo* korreliert.¹¹¹ Im hepatozellulären Karzinom (HCC) konnte die Hochregulation von miR-483-5p mit einem zeitnahen Rückfall, sowie *in vitro* durch die Herunterregulation von *ALCAM* (*activated leukocyte cell adhesion molecule*) mit Invasion und Metastasierung assoziiert werden.¹¹² Ähnliche Ergebnisse identifizierte auch die Arbeit von Ma et al.¹⁰⁶, welche die Proliferationsförderung an murinen HCC-Zellen durch die inhibitorische Wirkung von miR-483 auf *SOCS3* beschrieb.¹⁰⁶

Neben den eigentlichen miRs sind auch Faktoren, die die miR-Biogenese regulieren für die HB-Tumorgenese relevant. Eine wichtige Rolle kommt der LIN28-Familie zu, die sich in Säugetieren aus den strukturell sehr homologen LIN28A und LIN28B zusammensetzt. Beide sind in eine Vielzahl an biologischen Vorgängen während der Entwicklung, wie dem Erhalt der Pluripotenz oder dem Glucosemetabolismus eingebunden.¹¹³ In Kontext des HBs konnte gezeigt werden, dass bereits die Überexpression von LIN28B für eine Tumorinitiation ausreichend ist und diese über die Aktivierung eines onkofetalen Expressionsprogramms die Ausbildung eines aggressiven, embryonalen Tumorphänotyps fördert.⁵³ Besonders entscheidend für die Funktion der LIN28-Familie ist dabei die Kontrolle der let7-miRs, die durch die Blockierung verschiedener Schritte der miR-Prozessierung ihre Repression bedingt, was die Derepression verschiedener Onkogene wie *KRAS*, *MYC* oder *HMGA2* nach sich zieht und damit das Tumorwachstum und die Metastasierung erleichtert.¹¹³

Trotz der guten Genauigkeit spielen die Gen- und miR-Signaturen bis dato lediglich eine Rolle in der HB-Forschung, da die überwiegende Zahl der Patienten bereits präoperativ stratifiziert und behandelt wird. Die Entwicklung von wenig-invasiven, schnell detektierbaren und robusten Markern, die auch zukünftig in der Klinik leicht Anwendung finden, stellt daher eine wichtige Aufgabe dar.

1.2 Ziele der Arbeit

Obwohl es sich beim HB um den häufigsten Lebertumor im Kindesalter handelt, sind die molekularen Hintergründe insbesondere seiner klinischen Heterogenität weitestgehend unbekannt. Zahlreiche Studien, die sich dem genetischen Profil des HBs widmeten und damit eine hohe Prävalenz an Wnt-Signalwegsmutationen in nahezu allen HB-Patienten, neben einer sonst äußerst niedrigen Mutationsrate identifizierten, zeigten auf, dass weniger DNA-Mutationen und viel mehr andere Faktoren die divergente klinische Manifestation bestimmen. Der Einfluss deregulierter Genexpression unter anderem von embryonalen Signalwegen wie dem Wnt- oder IGF2-Signalweg auf die Initiation und Progression des HBs konnte bereits gezeigt werden und ebnete den Weg zur Entwicklung prognostischer Marker, die eine erste Risikostratifizierung von HB-Patienten ermöglichten. Jedoch werden diese von zahlreichen Limitierungen hinsichtlich fehlender Reproduzierbarkeit ihrer klinischen Relevanz, Komplexität im diagnostischen Handling oder unzureichendem Wissen zur biologischen Bedeutung begleitet.

Ziel dieser Arbeit war, molekulare Mechanismen und Faktoren durch genomweite Analysen zu identifizieren, die die klinische Heterogenität des HBs erklären und eine optimierte Risikostratifizierung ermöglichen können.

Basierend auf dem Methylomprofil von 40 pädiatrischen Lebertumoren sollte zunächst der epigenetische Fußabdruck hinsichtlich globaler Methylierungsmuster, differentiell methylierten Regionen, klinischer Relevanz und Kopienzahlveränderungen studiert werden. Zudem sollte das globale Transkriptionsprofil von 11 pädiatrischen Lebertumoren auf eine mögliche Assoziation mit den definierten epigenetischen Gruppen untersucht werden. Die anschließende Integration beider Datensätze sollte eine umfassende Korrelation von Methylierung und Genexpression und die Identifizierung von Kandidatengenen gewährleisten. Darüber hinaus sollten anhand der genomweiten Analysen molekulare Mechanismen gefunden werden, die bei der Metastasierung von HBs eine Rolle spielen. Die Funktion identifizierter Kandidatengene und deren Einfluss auf die Proliferation, Motilität, Migration, Invasion und Selbsterneuerung der Lebertumorzellen sollte in Form von genspezifischen Überexpressions- und Knock-down-Studien beleuchtet werden.

Ferner galt es, das Risikostratifizierungspotential der vier-miR-Signatur⁵² in einer unabhängigen Patientenkohorte zu testen, sowie das Risikostratifizierungspotential von miR-483, welche aufgrund seiner Implikationen mit dem Wnt- und IGF2-Signalweg von Interesse war, als neuen Kandidaten zu validieren.

2 MATERIAL

2.1 Zelllinien

HepG2	Homo sapiens	HB	ATCC, Manassas, USA
Hep3B	Homo sapiens	HCC	ATCC, Manassas, USA
HepT1	Homo sapiens	HB	Pietsch et al. ¹¹⁴
HUH6	Homo sapiens	HB	JCRB, Osaka, Japan
HUH7	Homo sapiens	HCC	ATCC, Manassas, USA
RMS13	Homo sapiens	Rhabdomyosarkom	ATCC, Manassas, USA

2.2 Zellkulturmaterialien

Dimethylsulfoxid (DMSO), steril	Merck, Darmstadt, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Fetales Kälberserum (FCS), steril	Invitrogen, Karlsruhe, D
Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep; 10.000 U/ml Pen, 10.000 µg/ml Strep)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI1640)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypsin-EDTA 0,05%	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypsin-Neutralisierungslösung, steril	Lonza, Basel, Schweiz

2.3 Bakterien

<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) DH5α	Invitrogen, Karlsruhe, D
---	--------------------------

2.4 Plasmide und siRNAs

FOPFlash <i>Firefly</i> luciferase reporter	Prof. Dr. Frank Kolligs, LMU München
pcDNA3-FLAG-TRIM71	Prof. Dr. Jong Heon Kim, Goyang, Korea
pcDNA3-SP8-VSV	Alexandra Wagner, aus dieser Arbeit
pcDNA3-VSV	Prof. Dr. Heiko Hermeking, LMU München
pCMV-Tag2B-FLAG-SP8	Milona et al. ¹¹⁵
pEGFP-N1	ClonTech, Mountain View, CA, USA
pLKO5d.SFFV.dCas9-KRAB.P2A.BSD	Prof. Dr. Jan-Henning Klusmann, Universitätsklinikum Halle (Saale)
pPlat-dCas9	Alexandra Wagner, aus dieser Arbeit
pPlat-dCas9-sfGFP-KRAB	Alexandra Wagner, aus dieser Arbeit
pPlat-TET-gRNA2	Morita et al. ¹¹⁶

pRL-CMV <i>Renilla</i> luciferase plasmid	Promega, Mannheim, D
pRTR	Jackstadt et al. ¹¹⁷
pRTR-SP8-VSV	Alexandra Wagner, aus dieser Arbeit
pUC19	Prof. Dr. Heiko Hermeking, LMU München
siGENOME Human non-targeting control	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
siGENOME Human SP8 siRNA smart pool	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
siGENOME Human TRIM71 siRNA smart pool	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
TOPFlash <i>Firefly</i> luciferase reporter	Prof. Dr. Frank Kolligs, LMU München

2.5 Enzyme

BamHI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, D
DNaseI	Sigma-Aldrich, St.Louis, MD, USA
EcoRI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, D
Hot-start Taq DNA Polymerase	Sigma-Aldrich, St Louis, MD, USA
<i>Micrococcal</i> Nuclease	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
NheI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, D
NotI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, D
Phusion DNA Polymerase	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St.Louis, MD, USA
RNase A	Sigma-Aldrich, St.Louis, MD, USA
SfiI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, D
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, D
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, D

2.6 Antikörper

Anti-E-Cadherin, Kaninchen (WB, IF)	Cell signaling technology, Danvers, USA
Anti-GFP, Kaninchen (WB)	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
Anti-H3, Kaninchen (WB)	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Anti-IgG, Maus (ChIP)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Anti-Kaninchen Alexa555 (IF)	Invitrogen, CA, USA
Anti-Kaninchen HRP (WB)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Anti-Maus HRP (WB)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Anti-Vimentin, Kaninchen (IF)	Invitrogen, CA, USA
Anti-Vimentin, Maus (WB)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Anti-VSV-G, Kaninchen (WB, ChIP)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MD, USA
Anti- β -Actin, Kaninchen (WB)	Cell signaling technology, Danvers, USA

Anti- β -Catenin, Kaninchen (WB)

Cell signaling technology, Danvers, USA

2.7 Kits

Bradford Protein Assay Solution

Bio-Rad, München, D

Dual-Luciferase Reporter Assay System

Promega, Mannheim, D

EpiTect Bisulfite Kit

Qiagen, Hilden, D

NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix

New England Biolabs GmbH, Frankfurt, D

QIAprep Spin Midiprep Kit

Qiagen, Hilden, D

QIAprep Spin Miniprep Kit

Qiagen, Hilden, D

QIAquick Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden, D

QIAquick PCR Purification Kit

Qiagen, Hilden, D

SYBR Green Master Mix

Bio-Rad, Hercules, CA, USA

TaqMan MicroRNA Assay für let7a

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

(ID 000377)

TaqMan MicroRNA Assay für mir-100

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

(ID 000437)

TaqMan MicroRNA Assay für miR-371

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

(ID 000559)

TaqMan MicroRNA Assay für miR-373

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

(ID 000561)

TaqMan MicroRNA Assay für miR-483-3p

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

(ID 002339)

TaqMan MicroRNA Assay für miR-483-5p

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

(ID 002338)

TaqMan MicroRNA Assay für RNU43

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

(ID 001095)

TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

2.8 Puffer und Lösungen

Block-Lösung (IF)

5% BSA

0,3% TritonX-100 in PBS

Block-Lösung (WB)

2,5% dry milk in ddH₂O

ChIP-Verdünnungspuffer

0,01% SDS

1% Triton X-100

1,2 mM EDTA

16,7 mM Tris-HCl (pH 8,1) in ddH₂O

2 MATERIAL

Einfrrier-Medium	48,8% FCS 39% DMEM 12,2% DMSO in ddH ₂ O
Elutions-Puffer	1% SDS 100 mM NaHCO ₃ in ddH ₂ O
Kristallviolett-Färbelösung	0,5% Kristallviolett in 20% Methanol und 80% ddH ₂ O
Lämmli-Puffer	125 mM TrisHCl (pH 6,8) 4% SDS 20% Glycerol 0,05% Bromphenolblau (in H ₂ O) 10% β-Mercaptoethanol in ddH ₂ O
LB-Agar	4% LB-Agar in ddH ₂ O
LB-Medium	2,5% LB-Medium in ddH ₂ O
LiCl-Wasch-Puffer	250 mM LiCl 1% NP-40 1% Desoxycholsäure (DOC) 1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl (pH 8,1)
MTT1-Lösung	200 mg MTT in 40 ml PBS
MTT2-Lösung	10% SDS 0,037% HCl in ddH ₂ O
Nuklei-Lysepuffer	1% SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris-HCl (pH 8,1) in ddH ₂ O
PBS 2x	Apotheke, LMU München
PBS-T	0,1% Tween 20 in PBS (1x)
PFA-Lösung	3,7% PFA in PBS
Protein-Lyse-Puffer	50 mM HEPES 1 mM EDTA 0,7% DOC 1% NP-40 5 mM LiCl in ddH ₂ O
TBE-Puffer	0,45 M Tris 0,45 M Borsäure

2 MATERIAL

TE-Puffer	10 mM EDTA in ddH ₂ O 10 mM Tris (pH 7,8) 1 mM EDTA
Tris-Glycin-SDS Laufpuffer 10x	14,4% Glycin 3% Tris 1% SDS pH 8,3-8,7
Wasch-Puffer I	0,1% SDS 1% Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris-HCl (pH 8,1) 150 mM NaCl in ddH ₂ O
Wasch-Puffer II	0,1% SDS 1% Triton X-100 2mM EDTA 20mM Tris-HCl (pH 8,1) 500 mM NaCl in ddH ₂ O
Zell-Lyse-Puffer	5mM PIPES (pH 8,0) 85mM KCl 0,5% NP-40 in ddH ₂ O

2.9 Primer und Oligos

Tabelle 1: Primer und Oligos

Name	Vorwärtssequenz 5'-3'	Reverse Sequenz 5'-3'
Primer zur Vektorklonierung		
#1	TGCGGATCCGGAACCATGGCAAC TTCACCTTCTAGGGGAAGAA	TGCGAATTC CTCTAGGCCGTTGCGGTGCC
#2	TGCGCTAGC AGAGGCTCTCCAAGAAAAG	TGCGCGGCCGC GGGCTCTTCTCCCTTCTCCAA
#3	TGCGGATCCG CAGGTGGAGGTGGAAGCGGTAG	TGCGGATCCT CAGGGCTCTTCTCCCTTCTCCAAC
Sequenzierprimer		
T7	TAATACGACTCACTATAGGGA	
SP6		ATTTAGGTGACACTATAGAATAG
U6	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC	
KRAB_seq1	GGAAAGTGGACGGCATTGGTAG	
KRAB_seq2	GAGCTCTACAAAGGTGGAGGTC	
qPCR-Primer		
SP8	CACTTCTAGGGGAAGAACCGAG	GCTGGGGCTGCCTATCTTATT
FGF8	CCCCTTCGCAAAGCTCATC	CCCCTTCTTGTTTCATGCAGA
Vimentin	AGCAATATGAAAGTGTGGCTGC	GTCATTGTTCCGGTTGGCA
E-Cadherin	CGAGAGCTACACGTTACGG	TTGTCGACCGGTGCAATCT

2 MATERIAL

ZEB1	TCAAATGCACTGAGTGTGGAAAA	GCAGTTTGGGCATTCATATGG
TWIST1	TCCGCGTCCCCTAGCAG	TGTCCATTTTCTCCTTCTCTGGA
SPP1	GTTTCGCAGACCTGACATCCA	CCATTCAACTCCTCGCTTTCC
DLK1	GCAACCCCAAAATGGATTC	GAGGTCACGCACTGGTCACA
SEMA5A	TAGCCAGGTGCTGAAGAGG	GTCTCACACACCAACACAGG
CAV2	CACCGGCTCAACTCGCAT	TGCAGATCCACACTTTGTCAAAG
TRIM71	GCTGTGGAAGGTAGAAAAGATCC	GCTTGTTGAGGTTTTGCCG
TBP	GCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT
AXIN2	TATCCAGTGATGCGCTGACG	TGTTTCTTACTGCCACACGAT
CCND1	TCACACGCTTCTCTCCAGA	AGGCTTGA ^{CT} CCAGCAGGG
DKK1	GCTGCCCGGGAATTACT	TGGTTTCTCAATTTCTCCTCG
LGR5	ACAGCAGTATGGACGACCTTCA	CAGGTCTTCTCAAAGTCAAGCA
ChIP-qPCR-Primer		
SP8 BS1	CAGAGTTTGCAGCCCTAGG	AGGGTCTGGGCTAGGGGA
SP8 BS2-5	CTAGCCCAGACCCTCAATCC	GA ^{ACT} GGGGCCTGGATGC
Primer für Pyrosequenzierung		
TRIM71_P1 (PCR)	GAGTGTAAGGTTTTTAGGGTTATATT	Biotin-AACCTACCTTCATTAATTC
TRIM71_P1 (Seq)	GGTTTTTAGGGTTATATTGTAAT	
TRIM71_P2 (PCR)	GTTTTTTTAGGTAAGAAGTTAGGGTAG	Biotin-ACTCACCCCTACATTTAATCCCAA ^{ACT}
TRIM71_P2 (Seq)	AGTTAGGGGGTAGTTA	
TRIM71_P3 (PCR)	TTGAGATTAAGGTGATAAATTAGTGT	Biotin-TCCTCCAAAAATATCCTAAA ^{ACT} CTCT
TRIM71_P3 (Seq)	ATTAATAGGTAGTGAGGT	
guideRNAs für CRISPR interference		
gRNA-CMV	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTG GAAAGGACGAAACACCGGCTGCA GAAGTTGGTCTGTG	GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTAT TTCTAGCTCTAAAACCAGACCAA CTTCTGCAGCC
gRNA-1	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTG GAAAGGACGAAACACCGCCCCG GGCCCGCGGCCAT	GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTAT TTCTAGCTCTAAAACATGGCGCGC GGCCCCGGGGC
gRNA-2	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTG GAAAGGACGAAACACCGACTCAC AGGCAGCTCAGCG	GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTAT TTCTAGCTCTAAAACCGCTGAGCT GCCTGTGAGTC
gRNA-3	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTG GAAAGGACGAAACACCGCTTCGG TAAGGCGCGCTGA	GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTAT TTCTAGCTCTAAAACCTCAGCGCGC CTTACCGAAGC
gRNA-4	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTG GAAAGGACGAAACACCGAGCGT GCGGGTCGGTACTG	GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTAT TTCTAGCTCTAAAACCAGTACCGA CCCGCACGCTC
gRNA-5	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTG GAAAGGACGAAACACCGTTCAGC GCATCCCTAGTGA	GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTAT TTCTAGCTCTAAAACCTACTAGGG ATGCGCTGAAC

Sequenzen von Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen

2.10 Chemikalien und Reagenzien

1st strand buffer

Invitrogen, Karlsruhe, D

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem, Darmstadt, D
6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Agarose	PeQLab, Erlangen, D
Albumin Fraction V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München, D
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	SERVA, Heidelberg, D
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, D
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim, D
Desoxycholsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, D
dNTPs (10 mM)	Roche, Basel, Schweiz
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma, Steinheim, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
FuGene Transfektionsreagenz	Promega, Madison, WI, USA
Gene Ruler 1 kb DNA ladder	Fermentas St.Leo-Rot, D
Gene Ruler 100 bp DNA ladder	Fermentas St.Leo-Rot, D
Glycin	GERBU Biotechnik, Gaiberg, D
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe, D
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Lithiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Matrigel	Corning, New York, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
MTT Formazan Pulver	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Nonidet-P40	Sigma-Aldrich, St.Louis, MD, USA

Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas St.Leo-Rot, D
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D
Piperazine-N,N-Bis-2 Ethen-Sulfonsäure (PIPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Protein G-Agarose-Beads	Roche, Mannheim, D
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Binding Buffer	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Denaturation Buffer	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Gold Q24 Reagents	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Wash Buffer	Qiagen, Hilden, D
Random hexamer primer	Roche, Basel, Schweiz
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdeoxycholat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, D
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München, D
Streptavidin-beschichtete Sepharose-Beads	GE Healthcare, Frankfurt, D
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
TRI Reagent RNA Isolation Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ultra Pure TM DNase/RNase-freies destilliertes Wasser	Life Technologies GmbH, Ismaning, D
Vectashield with DAPI	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Western Blot Protein Standard	Bio-Rad, München, D

2.11 Verbrauchsmaterialien

12-Well-Platten, nicht-pyrogen	NUNC, Langenselbold, D
24-Well-Platten, nicht-pyrogen	NUNC, Langenselbold, D
4-12% Tris-Glycin Gele	Invitrogen, Karlsruhe, D
4-20% Tris-Glycin Gele	Invitrogen, Karlsruhe, D
6-Well-Platten, nicht-pyrogen	NUNC, Langenselbold, D
8-Well PCR-Streifen	Eppendorf, Hamburg, D

96-Well-Platten, nicht-pyrogen	NUNC, Langenselbold, D
Biosphere Filterspitzen (10ul, 100ul, 1000ul)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Costar Stripette serologische Pipetten 10ml	Corning GmbH, Wiesbaden, D
Costar Stripette serologische Pipetten 25ml	Corning GmbH, Wiesbaden, D
Costar Stripette serologische Pipetten 5ml	Corning GmbH, Wiesbaden, D
Deckgläser	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Falcon Reaktionsgefäß 15ml/50ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Glasspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Handschuhe, Nitril Extra, Powder-free	Halyard Health Inc., Alpharetta, USA
Handschuhe, Vasco Nitril soft blue	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Objektträger	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Parafilm	Brand, Wertheim, D
PCR 96-Wellplatten	PeQLab, Erlangen, D
Petrischale 100mm, beschichtet	NUNC, Langenselbold, D
Petrischale 100mm, unbeschichtet	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen (10ul, 100ul, 1000ul)	Sarstedt, Nümbrecht, D
PyroMark Q24 Platte	Qiagen, Hilden, D
Safe-lock Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Safe-lock Eppendorf Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Trans-Blot Turbo Mini PVDF Transfermembran	Bio-Rad, München, D
Transwell Zellkultur-Einlagen	Corning Inc., Corning, NY, USA
Zählkammern	KOVA international, Garden Grove, CA, USA
Zellkultur T-Flasks 150m ²	NUNC, Langenselbold, D
Zellkultur T-Flasks 25m ²	NUNC, Langenselbold, D
Zellkultur T-Flasks 75m ²	NUNC, Langenselbold, D
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D

2.12 Laborausstattung

Agarose Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München, D
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, D
CO ₂ -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Tokio, Japan
Diana III Chemilumineszenz Imager	Raytest GmbH, Straubenhardt, D
Excella E24 Inkubator	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Feinwaage Te1245	Sartorius, Göttingen, D
GelJet Imager Version 2004	Intas, Göttingen, D

GENios Mikroplattenleser	Tecan, Crailsheim, D
Heizblock MR 3001	Heidolph, Kehlheim, D
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Inkubator	Memmert, Schwabach, D
Kamera AxioCam MRm	Zeiss, Jena, D
Mastercycler ep realplex2	Eppendorf, Hamburg, D
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg, D
Mikroliterzentrifuge MZ014	G. Kisker, Steinfurt, D
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena, D
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena, D
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg, D
NanoDrop 1000 Instrument	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Powershot G6 Kamera	Canon, Tokio, Japan
PyroMark Q24 System	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Vacuum Workstation	Qiagen, Hilden, D
Schüttler, Rock-N-Roller	G. Kisker, Steinfurt, D
Schüttler, Unimax 1010	Heidolph, Schwabach, D
SimpliAmp Thermal Cycler	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Thermomixer Kompakt	Eppendorf, Hamburg, D
Transblot Turbo-Blot	Bio-Rad, München, D
Vortexer Genie2	Scientific Industries, NY, USA
Waage EMB 600-2	KERN & SOHN, Ballingen, D
Wasserbad GFL 1083	GFL, Wien, Österreich
Zentrifuge 5702	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge J2-21	Beckman Coulter, Krefeld, D
Zentrifuge LMC-3000	G. Kisker, Steinfurt, D

2.13 Software und Webtools

AxioVision	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Chromas 1.4.5	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australien
CRISPOR ¹¹⁸	http://crispor.tefor.net/
Cytoscape 3.7.2 ¹¹⁹	http://www.cytoscape.org/
DAVID ¹²⁰	https://david.ncifcrf.gov/
Ensembl	http://www.ensembl.org/
everyVector	http://www.everyvector.com/

2 MATERIAL

GraphPad Prism 8.2.1

ImageJ 1.52a

NCBI Blast

NEBioCalculator

Primer3

PyroMark Q24 Advanced Software

R Software 3.5.1¹²¹

GraphPad Software, San Diego, USA

National Institute of Health, Bethesda,

Maryland, USA

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>

<http://frodo.wi.mit.edu/>

Qiagen, Hilden, D

<http://www.R-project.org/>

3 METHODEN

3.1 Patienten

Hepatoblastomgewebe sowie korrespondierendes Normalgewebe der Leber entstammte von Patienten, die in der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie des Dr. von Haunerschen Kinderspitals operiert wurden. Vorab wurde von jedem Patienten die Einverständniserklärung unterzeichnet, sowie das Studienprotokoll von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt (Antragsnummer 431-11).

3.2 Prokaryotische Kulturen

3.2.1 Kultivierung und Lagerung von *E.coli*-DH5 α

Um eine *E.coli*-Flüssigkultur anzulegen, wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsreagenz Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) oder Kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) versetzt, mit einer Bakterienkolonie angeimpft und 16 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Lagerung von kompetenten *E.coli*-DH5 α erfolgte bei -80°C.

3.2.2 Transformation von *E.coli*-DH5 α mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden zunächst 50 μl *E.coli*-DH5 α auf Eis aufgetaut, mit 50-100 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der darauffolgende Hitzeschock für 40 sec bei 42°C ermöglichte die Aufnahme der Plasmid-DNA. Nach weiteren 2 min Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 250 μl SOC-Medium und eine weitere Inkubation bei 37°C und 550 rpm von mindestens einer Stunde. Dann wurden 50 μl der Bakteriensuspension auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Aufbewahrung der Kolonien von bis zu 3 Monaten wurden die Agarplatten mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert.

3.3 Eukaryotische Zellkulturen

3.3.1 Zellkulturbedingungen

Für die Durchführung der *in vitro*-Experimente wurden die drei HB-Zelllinien HepG2, HUH6 und HepT1, sowie zwei Zelllinien eines hepatozellulären Karzinoms (Hep3B und HUH7) verwendet. Zur Optimierung des *CRISPR interference*-vermittelten Knock-downs von FGF8 wurde die Rhabdomyosarkomzelllinie RMS13 genutzt. Alle Zelllinien wuchsen in RPMI1640, welches mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Pen-Strep versetzt war, und wurden bei 37°C bei feuchter Atmosphäre und 5% CO₂ kultiviert. Bei Erlangung einer Konfluenz von etwa 90% (ca.

2-3 mal pro Woche) wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA in einem Verhältnis von 1:10 (Hep3B, HUH7, HepT1, RMS13) bzw. 1:5 (HepG2, HUH6) passagiert.

3.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Die Zellen wurden zunächst mit Trypsin-EDTA abgelöst, die Reaktion mit FCS-supplementiertem Medium gestoppt, die Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon überführt und für 5 min bei 0,2 *xg* zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss mit 500 µl serumfreiem DMEM-Medium resuspendiert, mit 9,5 ml Einfriermedium verdünnt und in Kryoröhrchen übertragen. Diese wurden für 48 h bei -80°C gelagert, sowie anschließend dauerhaft in flüßigem Stickstoff präserviert.

Um kryopräservierte Zelllinien aufzutauen, wurden diese zu 5 ml vorgewärmten RPMI1640/FCS/Pen-Strep hinzugegeben, bei 0,2 *xg* für 5 min zentrifugiert, das Pellet in 1 ml RPMI1640/FCS/Pen-Strep resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium ausgetauscht.

3.4 Proliferationsassay

Um die Zellproliferation zu bestimmen, wurden 5000 Zellen/ Well einer 96-Well-Platte in 100 µl RPMI1640-Medium ausgesät. Dann wurden 10 µl/ Well der MTT1-Lösung hinzugegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von 100 µl/ Well der MTT2-Lösung mit sofortiger Durchmischung der Wells leitete die Zelllyse ein. Erneut folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Anschließend wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm am *GENios Plate Reader* bestimmt.

3.5 Wound healing Assay

Transient bzw. stabil transfizierte Zellen wurden in hoher Dichte im 12-Well-Format ausgesät, um am darauffolgenden Tag Konfluenz zu erreichen. Eine „Wunde“ von ca. 1 mm Breite wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze dem Zellrasen zugefügt und die Wundschließung für 96 h beobachtet. Alle 24 h wurde der *Status quo* anhand der Powershot G6-Kamera, welche mit dem Axiovert 40CFL Mikroskop verbunden war, dokumentiert. Die Bildanalyse erfolgte mit *ImageJ*.

3.6 Boyden Chamber Assay

Zur Analyse der Invasion wurden Transwell-Zellkultureinsätze 2 h vor ihrem Gebrauch mit 50 µl Matrigel-Lösung (1:1 Verdünnung mit RPMI1640) beschichtet bzw. unbeschichtet zur Studie der Migration verwendet und in 24-Well-Platten, welche mit 750 µl RPMI1640 und 30% FCS als Chemoattraktant versehen waren, eingestellt. 1×10^5 Zellen zur Studie der Invasion bzw. $0,7 \times 10^5$ Zellen zur Analyse der Migration wurden in nicht-supplementiertem RPMI1640 im oberen Kompartiment ausgesät und für 48 h (Migration) bzw 72 h (Invasion) inkubiert. Anschließend

wurden die Zellen mit 3,7%iger PFA-Lösung für 2 min fixiert, mit Methanol 10 min permeabilisiert, mit 0,5%iger Kristallviolett-Lösung 5 min angefärbt und zweimal mit PBS gewaschen. Mit einem Wattestäbchen wurden die Zellen im oberen Kompartiment entfernt und die Zellzahl der migrierten/ invasiven Zellen durch die Dokumentation mit dem Axiovert 40CFL Mikroskop und der damit verbundenen Powershot G6-Kamera festgehalten. Die Bildanalyse wurde mit *ImageJ Cell Counter Plugin* durchgeführt.

3.7 Klonogener Assay

5000 Zellen/ Well wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 8-10 Tage bei 37°C kultiviert. Dann wurden die Zellen mit Methanol für 10 min fixiert und permeabilisiert, für 5 min mit 0,5%iger Kristallviolett-Lösung gefärbt und zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Nach Trocknung der Platten erfolgte die Quantifizierung der Kolonien mit Hilfe des *GelJet Imagers* und anschließender Auswertung der Bilder mit dem *ImageJ Cell Counter Plugin*.

3.8 Luciferase Assay

Zur Durchführung des Luciferase Assays wurden 5×10^4 Zellen/ 12-Well ausgesät und am nächsten Tag mit den Reporterplasmiden pTOP (*Firefly*-Luciferase unter Kontrolle von TCF/LEF Bindestellen) und pRL-TK (*Renilla*-Luciferase zur Normalisierung der Transfektionseffizienz) bzw. pFOP (*Firefly*-Luciferase unter Kontrolle von mutierten TCF/LEF Bindestellen) und pRL-TK mit *FuGENE HD* entsprechend Abschnitt 3.9.7 transfiziert (Plasmid-DNA-Verhältnis 10:1). 48 h nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der Lumineszenz anhand des *Dual-Luciferase Reporter Assay Systems* entsprechend der Herstellerangaben. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 min durch Zugabe von 250 µl 1x *Passive Lysis Buffer* (Promega) bei 250 rpm und Raumtemperatur lysiert. In einer weißen 96-Well-Platte wurden 100 µl *LARII* (Promega) vorgelegt und nach Abschluss der Lyse 20 µl Zellsuspension hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation im Dunkeln erfolgte die Messung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität mit dem *GENios Microplatereader*. Um die Reaktion zu stoppen und gleichzeitig die *Renilla*-Luciferase-Aktivität anzuregen, gab man 100 µl *Dual-GloTM Stop & Glo Reagent* (Promega) zu jeder Messung hinzu und inkubierte für weitere 10 min unter Lichtausschluss. Erneut konnte anhand des *GENios Microplatereader* die Lumineszenz dokumentiert werden.

3.9 DNA-Methoden

3.9.1 Isolation von genomischer DNA

Genomische DNA aus Patientengewebe wurde durch die technische Assistenz von Frau Fatemeh Promoli unter Anwendung der Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen.

3.9.2 Isolation von Plasmid-DNA

Am Vortag der Plasmid-DNA-Isolation wurden 5 ml Flüssigbakterienkultur angelegt und für 16 h inkubiert. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension bei 2360 xg für 4 min erfolgte die Isolation mittels *Qiagen MiniPrep Kit* gemäß den Angaben des Herstellers.

3.9.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten für die nachfolgende Klonierung wurde mit einem Reaktionsvolumen von 20 μ l durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsmixes findet sich in der nachfolgenden Auflistung (Tabelle 2). Das Zyklusprogramm ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 2: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsmixes

Hot-Start Reaktionspuffer (10x)	2 μ l
MgCl	1,2 μ l
DMSO	bis zu 0,6 μ l
<i>Forward</i> Primer (10 nM)	1 μ l
<i>Reverse</i> Primer (10 nM)	1 μ l
dNTPs (10 mM)	0,4 μ l
Hot-Start Taq DNA Polymerase	0,2 μ l
DNA Template	2 μ l
ddH ₂ O	auf 20 μ l

Tabelle 3: Zyklusprogramm der PCR

Zyklusschritte	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2 min	1x
Denaturierung	95	15 sec	40x
Annealing	56-72	15 sec	
Extension	72	20 sec	
Finale Extension	72	5 min	1x
Halten	14	∞	1x

3.9.4 Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in einem Gesamtvolumen von 20 μ l nach Herstellerangaben entsprechend der unten stehenden Auflistung (Tabelle 4).

Tabelle 4: Bestandteile des Restriktionsverdau

DNA	X μ l (1 μ g)
Reaktionspuffer (10x; Tabelle 5)	X μ l
Restriktionsenzym I	1 μ l
(Restriktionsenzym II)	X μ l
ddH ₂ O	auf 20 μ l

Die individuellen Puffer- und Temperaturbedingungen sind in nachfolgender Tabelle (Tabelle 5) zu finden.

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen der Restriktionsenzyme

	Temperatur	Reaktionspuffer - Einfachverdau	Reaktionspuffer - Doppelverdau
SfiI	50°C	Puffer G	1x Tango
BamHI	37°C	Puffer G/ 2x Tango	2x Tango
EcoRI	37°C	Puffer O/ 1x Tango	2x Tango
NheI	37°C	1x Tango	1x Tango
NotI	37°C	Puffer O	2x Tango

3.9.5 DNA-Ligation

Die Ligation von zwei DNA-Fragmenten erfolgte in einem Reaktionsansatz von 20 µl. Mit einem 3:1-Verhältnis von DNA-Fragment zu Plasmid-DNA wurden grundsätzlich die besten Klonierungsergebnisse erzielt. Die Menge an DNA-Fragment wurde anhand des NEBioCalculators (<http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) abhängig von dessen Länge bestimmt. Die Zusammensetzung des Reaktionsmixes kann nachfolgender Tabelle (Tabelle 6) entnommen werden. Alle Bestandteile wurden auf Eis pipettiert und anschließend bei 16°C über Nacht inkubiert. Nach der Hitzeinaktivierung von 10 min bei 65°C wurden 5 µl des Ansatzes entnommen und entsprechend Absatz 3.2.2 in kompetente *E.coli*-DH5α transformiert.

Tabelle 6: Reaktionsmix der DNA-Ligation

DNA-Fragment	X µl
Plasmid-DNA (linearisiert)	X µl (100 ng)
T4 DNA Ligase	1 µl
T4 DNA Ligase Puffer	2 µl
H ₂ O	auf 20 µl

3.9.6 Sanger-Sequenzierung

Die Überprüfung von DNA-Sequenzen, insbesondere von neu klonierten Plasmiden, erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung durch den *Sequencing Service* der biologischen Fakultät der LMU München. Dazu wurde 1 µl Sequenzierprimer zusammen mit 350 ng Plasmid-DNA in einem Reaktionsvolumen von 7 µl versendet. Die Sequenzierdaten konnten wenige Tage später auf der Homepage des Dienstleisters (<http://www.gi.bio.lmu.de/sequencing>) heruntergeladen werden. Das Programm *Chromas* und *NCBI blastn* ermöglichten die nachfolgende Sequenz-Analyse.

3.9.7 DNA-Transfektion

Um Plasmid-DNA in Zellen einzubringen wurde das nicht-liposomale Transfektionsreagenz *FuGENE HD* gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das Verhältnis von Transfektionsreagenz zu Plasmid-DNA betrug dabei 3:1.

Für die Durchführung der sogenannten "sitzend-Transfektion" wurden am Vortag 4×10^5 Zellen/Well in einer 6-Well-Platte ausgesät, um am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70-85% zu erreichen. Pro 6-Well-Ansatz wurden 9,9 μl *FuGENE HD* mit 3 μg DNA in 155 μl ddH₂O gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml serumfreiem RPMI1640-Medium versetzt. Der *FuGENE*-DNA-Mix wurde im Anschluss tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und über Nacht inkubiert. 24 h nach erfolgter Transfektion wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen entsprechend dem nachfolgenden Experiment verwendet.

Um Zellen in Suspension zu transfizieren wurden je Ansatz zunächst 3,3 μl *FuGENE HD* mit 1 μg DNA in 52 μl ddH₂O vermischt und für 10 min inkubiert. $3,2 \times 10^5$ Zellen in 944,7 μl serumfreiem Medium wurden darauffolgend mit der *FuGENE*-DNA-Mischung versetzt und für 6 min bei 850 rpm und 37 °C inkubiert. 1 ml Vollmedium wurde währenddessen in einem 6-Well vorgelegt und die Zell-*FuGENE*-DNA-Suspension hinzugegeben und über Nacht inkubiert. Ebenfalls 24 h nach Transfektion wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen entsprechend dem nachfolgenden Experiment eingesetzt.

3.9.8 Analytische Gelelektrophorese

Für die analytische Gelelektrophorese wurden 1%ige Gele verwendet. Dafür wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer gelöst (1x) und 6 μl des interkalierenden Agens Ethidiumbromid zu 100 ml Agarose-Lösung hinzugegeben, um eine Visualisierung von DNA in ultraviolettem Licht zu ermöglichen. Die Proben wurden in einem 6:1 Verhältnis mit Ladepuffer (6x) gemischt. Zur Größenbestimmung der DNA wurde der *100 bp DNA ladder* oder der *1 kb DNA ladder* verwendet. Die Separation der DNA-Fragmente erfolgte bei 90-110 V bis die gewünschte Auftrennung erzielt wurde.

3.9.9 Bisulfitkonvertierung

Die Bisulfitkonvertierung von 1 μg genomischer DNA wurde mit dem *Qiagen EpiTect Bisulfite Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.9.10 Globale DNA-Methylierungsanalyse

Bisulfitkonvertierte DNA (siehe 3.9.9) von 28 HB-, 6 HCC-, 3 fibrolamellären HCC-, 3 malignen Rhabdoidtumoren der Leber- und 8 Normalleber-Proben wurde durch die Mikroarray-Unit am DKFZ Heidelberg nach Angaben des *Illumina HD*-Methylierungsprotokolls gegen den *Human Methylation 450 BeadChip*-Mikroarray hybridisiert. Alle Schritte der Datenprozessierung wurden mit dem *minfi Package* durchgeführt.¹²² Zunächst erfolgte die Präprozessierung mittels

stratifizierter Quantilnormalisierung, welche in der *preprocessQuantile*-Funktion implementiert ist.¹²³ Im Weiteren wurden alle CpG-Proben, die innerhalb eines SNPs lagen (17.541 CpG-Proben) sowie alle auf dem X- oder Y-Chromosom lokalisierten Proben (11.458 CpG-Proben) von der *Downstream*-Analyse ausgeschlossen, was insgesamt in einer Anzahl von 456.513 CpG-Proben für jede der 48 Proben resultierte. Zur Annotation der Proben diente die Manifest-Datei, welche auf dem humanen Referenzgenom UCSC *hg19* basierte. Die Angabe der Methylierungswerte erfolgte in Form von β -Werten, welche Werte zwischen 0 für nicht-methyliert und 1 für 100% methyliert annehmen können. Um Verzerrungen aus unterschiedlichen Messzeitpunkten auszuschließen, wurden die β -Werte mit der *ComBat*-Funktion aus dem *SVA Package* im letzten Schritt korrigiert.¹²⁴

3.9.11 Pyrosequenzierung

Zur Bestimmung der DNA-Methylierung einer ausgewählten Region von *TRIM71* mittels Pyrosequenzierung wurde 1 μ l bisulfitkonvertierter DNA (siehe 3.9.9) unter Verwendung des entsprechenden Primerpaares (siehe Tabelle 1) amplifiziert. Die PCR-Reaktion, welche sich aus 500 nM Primer fw, 500 nm Primer rv, 1x Hot start Taq Buffer, 2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, Hot start Taq Polymerase (1U), Nuklease-freiem ddH₂O (insgesamt 20 μ l) zusammensetzte, wurde entsprechend Abschnitt 3.9.3 durchgeführt. Die Annealing-Temperatur lag für TRIM71_P1 (PCR) bei 49°C, für TRIM71_P2 (PCR) bei 59°C und für TRIM71_P3 (PCR) bei 55°C.

Anschließend wurden 3 μ l des PCR-Produktes auf ein 1%iges Agarosegel zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation und zur Größenkontrolle des PCR-Produktes aufgetragen (siehe 3.9.8). Die übrigen 17 μ l wurden mit 4 μ l Streptavidin-beschichteten Sepharose-Beads, 40 μ l *PyroMark Binding Buffer* und 19 μ l Nuklease-freiem ddH₂O (insgesamt 80 μ l) versehen. Die vorbereitete Mischung wurde anschließend in eine 24-Well-PCR-Platte überführt und für mindestens 5 min bei 800 rpm geschüttelt. In der Zwischenzeit konnte der entsprechende Sequenzierprimer (siehe Tabelle 1; TRIM71_P1 (Seq), TRIM71_P2 (Seq) und TRIM71_P3 (Seq)) durch die Verwendung des *PyroMark Annealing Buffers* auf 0,3 μ M verdünnt werden und als 25 μ l-Aliquots auf die *PyroMark Q24 Platte* verteilt werden. Nach Ablauf der 5 Minuten wurde die PCR-Mischung durch die *PyroMark Q24 Vacuum Workstation* angesaugt, mittels *PyroMark Denaturation Buffer* denaturiert und der übrige, einsträngige, biotinylierte DNA-Strang in die *PyroMark Q24 Platte* eingebracht. Die Befüllung der Kartusche erfolgte nach Herstellerangaben mit *PyroMark Gold Q24 Reagents*. Abschließend wurde die Kartusche und die *PyroMark Q24 Platte* in das *PyroMark Q24 System* eingestellt und der Sequenzierlauf gestartet. Die Auswertung erfolgte mit der *PyroMark Q24 Advanced Software*.

3.10 RNA-Methoden

3.10.1 Isolierung von RNA

Zur Gewinnung von RNA aus Zelllinien wurde 1 ml *TRIzol* direkt auf die Zellen gegeben und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Um die Phasentrennung einzuleiten wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt, 15 sec gevortext, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss 15 min bei 12000 xg und 4°C zentrifugiert. Vorsichtig wurde die oberste Phase in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und die RNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und darauffolgender 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. Erneut wurde für 15 min bei 12000 xg und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde durch die Zugabe von 1,5 ml 70%igem, gekühltem Ethanol und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 7500 xg und 4°C gewaschen. Danach wurde das Pellet für 10 min luftgetrocknet und durch Zugabe von 50 µl ddH₂O (bei sehr kleinem Pellet 20-30 µl ddH₂O) für 15 min bei 55°C gelöst. Die Quantifizierung und Qualitätsbestimmung wurde mit dem UV-Spektrophotometer *NanoDrop 1000* durchgeführt. Dazu wurde 1 µl eluierte RNA gegen das entsprechende Elutionsreagenz (RNA-Elutionspuffer bzw. Nuklease-freies ddH₂O) als Referenz quantifiziert. Die Quantität konnte durch die Absorption bei 260 nm bestimmt werden. Die Beurteilung der Reinheit erfolgte anhand des optischen Dichte-Verhältnisses von A₂₆₀/A₂₈₀, wobei reine RNA ein Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 aufzuweisen hatte. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.10.2 RNA-Sequenzierung

1 µg reiner RNA von je 11 Tumorproben, 11 Normallebern und 4 Zelllinien wurde am Helmholtz-Zentrum München (Arbeitsgruppe Tim Strom) prozessiert. Zur Anreicherung des codierenden Transkriptoms wurde das *TruSeq Non-stranded RNA v2 Kit* verwendet. Die Sequenzierung von *100 bp-paired-end runs*, was in einer Gesamtzahl von 35-97 Millionen *reads* resultierte, wurde am *HiSeq2500*-System durchgeführt. Der *STAR aligner v 2.4.2a*¹²⁵ mit modifizierten Parametern (*--twopassMode = Basic*) wurde für das *split-read Alignment* der *reads* herangezogen. Als humanes Referenzgenom wurde *hg19* (GRCh37) zusammen mit der *UCSC knownGene*-Annotation genutzt. Die Quantifizierung der *reads*, welche mit Teilen annotierter Gene übereinstimmten, erfolgte mit dem *HTseq-count v0.6.0*¹²⁶.

Zur Bestimmung differentiell exprimierter Gene zwischen verschiedenen Analysegruppen wurden die quantifizierten *reads* mit Hilfe des *Bioconductor Packages DESeq2*¹²⁷ normalisiert und ausgewertet.

3.10.3 Reverse Transkription (RT)

Für die Synthese der cDNA wurden 2 µg RNA/ 7 µl Nuklease-freiem ddH₂O zusammen mit dem *SuperScript II Kit* verwendet. Zunächst wurden 5 µl *Random Hexamer Primer* zur RNA zugegeben und das Annealing der Primer bei 70°C für 10 min durchgeführt. Anschließend wurden je Probe 4 µl *1st strand buffer* (5x), 2 µl 0,1M DTT und 1 µl 10 mM dNTPs hinzugefügt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden dann für 2 min bei 42°C vorgewärmt, 1 µl *SuperScript II* zugegeben und für weitere 60 min bei 42°C inkubiert. Nach der Hitzeinaktivierung bei 70°C für 10 min wurde die cDNA mit 80 µl ddH₂O aufgefüllt, um ein Endvolumen von 100 µl zu erhalten.

3.10.4 Quantitative real-time PCR (Q-PCR)

Die genspezifische Expression wurde mittels quantitativer *real-time* PCR analysiert. cDNA, welche entsprechend Abschnitt 3.10.3 generiert wurde, wurde als Template zusammen mit dem *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* genutzt.

Der Reaktionsmix (20 µl) pro Well einer 96-Well-PCR-Platte setzte sich aus nachfolgenden Bestandteilen zusammen (Tabelle 7):

Tabelle 7: Reaktionsmix der Q-PCR

cDNA	2 µl
SYBR® Green Supermix	10 µl
Primer fw	1 µl
Primer rv	1 µl
ddH ₂ O	6 µl

Nach dem Verschluss der Platte mit einer durchsichtigen Folie, wurde diese kurz zentrifugiert, in den *Mastercycler ep realplex2* eingestellt und folgendes Zyklusprogramm gestartet (Tabelle 8):

Tabelle 8: Zyklusprogramm der Q-PCR

Zyklus Schritte	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2 min	1x
Denaturierung	95	15 sec	40x
Annealing	59	15 sec	
Extension	68	20 sec	

Die Datenanalyse erfolgte durch die *realplex* Software mit anschließender Berechnung der $\Delta\Delta Ct$ -Werte entsprechend Pfaffl und Kollegen¹²⁸. Das $\Delta\Delta Ct$ -Modell basiert dabei auf dem Vergleich eines Zielgens mit einem *Housekeeping*-Gen (hier: *TATA-box Binding Protein, TBP*) sowie dem Vergleich der Expression des Zielgens in der Behandlungsgruppe mit seiner Kontrollgruppe.¹²⁸ Die Bestimmung der *Ct*-Werte wurde stets in Dubletten durchgeführt und der sich daraus ergebende Mittelwert für die Kalkulation herangezogen.

3.10.5 Transfektion von siRNA

Lipofektion

Zur Einbringung von siRNA in HepT1-Zellen wurde die Methodik der Lipofektion gewählt. Dazu wurde das Transfektionsreagenz *Lipofectamine 2000* verwendet, welches eine kationische Liposomenformulierung darstellt.

Am Vortag wurden 1×10^5 Zellen/ 6-Well in 2 ml Vollmedium ausgesät, um zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 70-90% zu erreichen. Pro Ansatz wurden einerseits 100 pmol siRNA mit 250 μ l serumfreiem Medium und andererseits 5 μ l *Lipofectamine 2000* in 250 μ l serumfreiem Medium vermischt sowie beide Verdünnungen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zusammenführung beider Verdünnungen wurde für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im letzten Schritt wurde der komplette Ansatz tröpfchenweise zu den Wells gegeben und die Zellen je nach Fragestellung für 18-48 h bei 37°C inkubiert.

Elektroporation

Um siRNA in HUH7- und HUH6-Zellen einzuschleusen, wurde die Zellmembran durch einen kurzen elektrischen Impuls permeabilisiert. Hierfür wurden zunächst die Zellen trypsinisiert, 2×10^6 Zellen in 300 μ l serumfreiem Medium in die Elektroporationsküvette überführt und 100 pmol siRNA dazugegeben. Nach kurzer Durchmischung der Suspension wurde die Küvette in die Elektroporationsvorrichtung eingestellt und ein Impuls von 350 V für 10 ms angelegt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Je nach Fragestellung wurden die elektroporierten HUH7- und HUH6-Zellen im Anschluss in die entsprechenden Well-Platten verteilt und bei 37°C inkubiert.

3.11 Proteinbiochemische Methoden

3.11.1 Isolierung von Proteinen

Um Proteine aus Zellen zu gewinnen, wurden diese mit PBS gewaschen, 150 μ l Protein-Lyse-Puffer/ 6-Well auf die Zellen gegeben, die Zellen abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 xg und 4°C. Der Überstand, der die lysierten Proteine beinhaltetete, wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.11.2 Quantifizierung von Proteinen

Um die Proteinmenge zu bestimmen, wurden die Proteinlysate aus Abschnitt 3.11.1 auf Eis aufgetaut, 1:10 verdünnt und 10 μ l der Probe bzw. 10 μ l der BSA-Standardlösungen (200-1200 μ g/ml) mit 200 μ l einer 1:5 verdünnten *Bradford Protein Assay Solution* versetzt. Nach einer

Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Errechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe der Standardkurve, die sich aus den Messungen der BSA-Standardlösungen ergab.

3.11.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Je Probe wurden 25-50 µg Proteinlysate in 20 µl ddH₂O mit 5 µl 5x *Lämmli*-Puffer vermischt und für 10 min bei 99°C denaturiert. Nach kurzer Zentrifugation wurden diese auf ein SDS-TRIS-Glycin-Gel zusammen mit 4 µl *Page Ruler Prestained Protein Ladder* zur Größenabschätzung aufgetragen. Die diskontinuierliche Gelelektrophorese wurde bei 200-220 V und 110 mA für 50-70 min durchgeführt.

3.12 Immunologische Nachweisverfahren

3.12.1 Western Blot (WB)

Im Anschluss an die Polyacrylamidgelelektrophorese (Abschnitt 3.11.3) wurden die Proteine bei bis zu 25 V und 1,3 A für 10 min mit dem *Transblot Turboblot* auf eine PVDF-Membran übertragen. Um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen, wurde die Membran bei Raumtemperatur für 2-4 h in Block-Lösung eingelegt und danach zusammen mit der primären Antikörperlösung über Nacht bei 4°C rotiert. Nachdem die Membran 3x für 15 min mit PBS-T gewaschen worden war, folgte eine 1-stündige Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Die Detektion der HRP-vermittelten Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des *ECL Plus Detektionsreagenz* und der Entwicklermaschine *Diana III* durchgeführt.

3.12.2 Immunfluoreszenz (IF)

Vorab wurden 2x 10⁴ stabil transfizierte Hep3B-Zellen auf *Lab-Tek II Glasplättchen* ausgesät und für 6 Tage mit 100 ng/ml Tetracyclin induziert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 3,7%iger PFA-Lösung für 15 min fixiert, mit 100% Methanol für 10 min permeabilisiert, sowie mit Block-Lösung (IF) für 1 h blockiert. Es folgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper (1:200) in PBS + 0,1% Triton-X100 bei 4°C über Nacht in humider Atmosphäre. Die Zellen wurden im Anschluss 3x für 5 min mit PBS gewaschen, für 10 min mit PBS + 0,3% Triton-X100 permeabilisiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper in PBS + Triton-X100 unter Lichtausschluss für 45 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Zellen für 5 min mit PBS konnten im letzten Schritt die Glasplättchen mit *Vectashield Mounting Medium* + DAPI auf Objektträger aufgebracht und mit klarem Lack luftdicht verschlossen werden. Die Dokumentation erfolgte am *Axiovert135*

Mikroskop anhand des Programms *AxioVision*. Die Nachbearbeitung der Aufnahmen wurde mit *ImageJ* durchgeführt.

3.12.3 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Stabil transfizierte Hep3B-Zellen wurden in 100 mm-Zellkulturplatten ausgesät und für 48 h mit 100 ng/ml Tetracyclin induziert. 37%ige PFA-Lösung wurde tröpfchenweise zu den Zellen gegeben bis eine finale Konzentration von 1% erreicht wurde und die Platten für 10 min sanft rotiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde Glycin bis zu einer finalen Konzentration von 125 mM zu den Zellen hinzugegeben und die Platten auf Eis gestellt. Nachdem die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen wurden, wurden diese zunächst mit 500 µl Zell-Lysepuffer auf Eis für 10 min lysiert, die Zellen mit einem Zellschaber in einem 2 ml-Reaktionsgefäß gesammelt und für 5 min bei 4°C und 0,3 *xg* zentrifugiert. Die Zerstückelung des Chromatins wurde zunächst durch Hinzugabe von 7 µl *Micrococcal-Nuclease* für 7 min bei Raumtemperatur eingeleitet. Die Enzymaktivität wurde durch EGTA (20 mM) gestoppt und erneut wurde der Ansatz für 10 min bei 0,3 *xg* und 4°C zentrifugiert. Dann wurde das Pellet für weitere 10 min mit 200 µl Nuklei-Lysepuffer auf Eis behandelt. Die finale Fragmentierung des Chromatins bis zu einer Größe von 500 bp erfolgte durch Sonifikation bei einer Amplitude von 10% für 6 Zyklen von je 15 sec auf Eis. Der Ansatz wurde bei 12000 *xg* für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand mit 1800 µl ChIP-Verdünnungspuffer verdünnt und durch Zugabe von 100 µl *Protein-G-Agarose-Beads* für 1 h bei 4°C vorgeklärt. Durch Zentrifugation von 1 min bei 4000 *xg* und 4°C wurden die Beads gesammelt. 100 µl des Überstandes wurden als *Input* aufbewahrt, während 2 Aliquots à 950 µl des Überstandes mit 3 µg polyklonalem anti-VSV-G Antikörper bzw. als Negativkontrolle mit dem anti-Maus IgG-Antikörper versetzt und für 16 h bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert wurden. Nach Zugabe von 60 µl *Protein-G-Agarose-Beads* wurde für weitere 5 h bei 4°C inkubiert und im Anschluss durch mehrere Waschschriffe mit 1 ml Waschpuffer I, 1 ml Waschpuffer II, 1 ml LiCl-Waschpuffer und zweimal mit 1 ml TE-Puffer die Beads gewaschen. Für die Elution der Beads wurden je Ansatz 100 µl Elutions-Puffer hinzugegeben, die Proben bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert und dann für 1 min bei 4000 *xg* zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und die Elution der Beads nochmals wiederholt. Auch zu den *Input*-Proben wurden 200 µl Elutions-Puffer hinzugegeben und im Weiteren äquivalent behandelt. Um das reverse *Crosslinking* einzuleiten, wurden 8 µl 5M NaCl hinzugegeben und bei 65°C über Nacht inkubiert. Anschließend folgten eine 30-minütige Inkubation bei 37°C mit 1 µl RNAse A (10 µg/µl) und eine 90-minütige Inkubation nach Hinzugabe von 4 µl 0,5M EDTA, 8 µl 1M Tris-HCl, und einem 1 µl Proteinase K (10 µg/ml) bei 45°C. Im letzten Schritt wurde die DNA mit dem *Qiagen PCR Purification Kit* entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt.

3.13 Statistische Auswertung

Die Datendarstellung erfolgte in Form von Punkt- oder Säulendiagrammen mit Angabe des Mittelwertes und des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM). Für die statistische Auswertung wurde die Software *GraphPad Prism 8.2.1.0* genutzt und der Mann-Whitney-Test oder der ungepaarte *Student's t*-Test herangezogen. Der Kaplan-Meier-Schätzer wurde mit dem log-rank Mantel-Cox-Test ermittelt. Ein Wert von $P < 0,05$ wurde als signifikant eingestuft, Werte von $P < 0,01$ als hochsignifikant. Die Ermittlung differentiell exprimierter Gene bzw. differentiell methylierter CpG-Proben erfolgte mit der Statistiksoftware R und der *Bioconductor Repository*, sowie den jeweiligen *Packages DESeq2* und *minfi*. Die funktionelle Annotation von differentiell exprimierten Genen wurde mit der Plattform *DAVID (database for annotation, visualization and integrated discovery)* analysiert.¹²⁹

4 ERGEBNISSE

4.1 Die Heterogenität von pädiatrischen Lebertumoren anhand globaler Methylierungsmuster

Die globale Hypomethylierung stellt ein Charakteristikum humaner Krebserkrankungen dar und geht häufig mit einer selektiven Hypermethylierung von Genpromotoren einher. Ebenso weist eine solide Studienlage darauf hin, dass epigenetische Modifizierungen wie die DNA-Methylierung als prognostische und prädiktive Biomarker geeignet sind,¹³⁰ was bereits unter anderem im hepatozellulären Karzinom,¹³¹ dem Kolonkarzinom¹³² oder Medulloblastomen¹³³ gezeigt werden konnte.

Im Zusammenhang mit kindlichen Lebertumoren konnte eine fehlerhafte DNA-Methylierung, insbesondere die Hypermethylierung der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen als wichtiger Faktor in der Entwicklung und Progression von HBs ermittelt werden.^{25, 48} Allerdings fehlt ein weitreichendes Verständnis des Methyloms und sich daraus ableitender „Epidriver“ in kindlichen Lebertumoren, da nur wenige Studien diese Fragestellung bis dato umfassend adressierten.

4.1.1 Epigenetische Subgruppen kindlicher Lebertumore unterscheiden sich in ihrer genomischen Stabilität und der CpG-Insel-Methylierung

Dem zu begegnen erfolgte eine Analyse des genomweiten DNA-Methylierungsmusters von insgesamt 40 pädiatrischen Lebertumoren (PLT; 28 Hepatoblastome (HB), 6 hepatozelluläre Karzinome (HCC), 3 fibrolamelläre HCC (fIHCC), 3 maligne Rhabdoidtumore der Leber (MRT) und 8 Normallebern (NL) mittels *Infinium HumanMethylation450 BeadChip*. *T-distributed stochastic neighbour embedding*-Analyse (t-SNE) und unüberwachtes hierarchisches Clustering der 3000 variabelsten CpGs des Datensatzes legte dabei zwei DNA-Methylierungcluster offen, die sich beide stark von den Normalleberproben unterschieden (Abb. 3A+B). Diese werden im Folgenden als G1 bzw. G2 bezeichnet.

4 ERGEBNISSE

Bei näherer Betrachtung der globalen Methylierungsmuster zeigte sich, dass G2-Tumore eine globale Hypomethylierung im Vergleich zur Gruppe der NL oder G1-Tumore aufwiesen (Abb. 5A). Diese Hypomethylierung konnte auch in anderen epigenomischen Strukturen (N Shelf, S Shore/Shelf, siehe Anhang Abb. 29) detektiert werden. Die Hypermethylierung von CpG-Inseln manifestierte sich dagegen besonders in den G2-Tumoren und weist auf ein – für krebsähnliches Gewebe – typisches Methylierungsmuster hin, welches als sogenannter *CpG island methylator phenotyp* (CIMP) bekannt ist. CIMP ist durch eine breite Studienlage belegt und konnte mit der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und schlechter Prognose in vielen Krebsarten wie unter anderem im adulten HCC¹³⁵⁻¹³⁶ in Verbindung gebracht werden. 42% (59.923/ 142.971) der gemessenen CpGs, welche CpG-Inseln zuzuordnen waren, waren auch als Promotor-assoziiert klassifiziert, weshalb ebenso eine Hypermethylierung der Promotoreregionen und der Transkriptionsstartstelle augenscheinlich war (Abb. 5C+D).

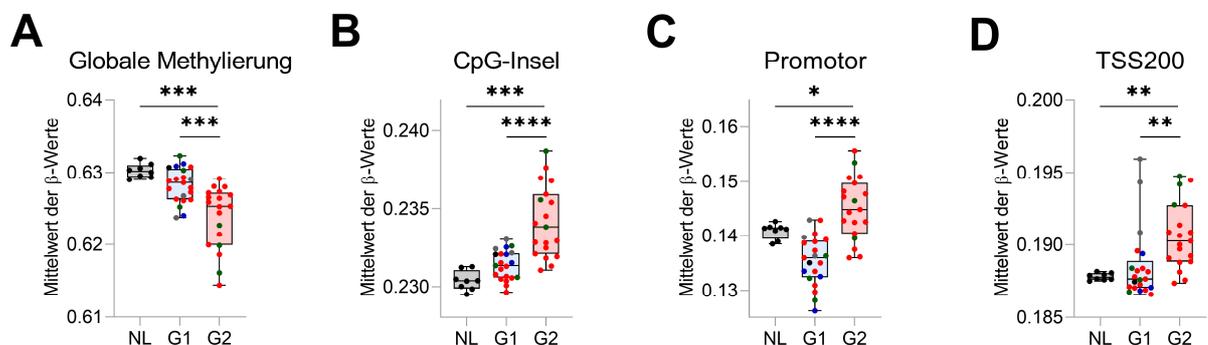


Abbildung 5: Boxplot-Darstellung der gemittelten β -Werte (A) aller CpGs, (B) CpG-Insel-assoziierten CpGs, (C) Promotor-assoziierten CpGs und (D) Transkriptionsstartstelle-nahen (TSS200) CpGs kategorisiert nach den epigenetischen Clustern NL, G1 und G2. NL: schwarze Punkte, HB: rote Punkte, HCC: grüne Punkte, fIHCC: blaue Punkte, MRT: graue Punkte.

In Übereinstimmung damit fanden wir Promotor-Hypermethylierung bereits bekannter Tumorsuppressorgene in kindlichen Lebertumoren wie *RASSF1*¹³⁷ oder *CASP8*¹³⁸ ausschließlich in den G2-Tumoren, während die Methylierung von G1-Tumoren deutliche Ähnlichkeit zu NL aufwies. Zusätzlich waren G2-Tumore von der Präsenz der Promotor-Hypermethylierung in vielen weiteren Genen mit ausgewiesener Tumorsuppressorgen-Funktion anderer Krebsarten gekennzeichnet. Dazu gehörten *MIR142*, *MARVELD1*, *IFITM1*, *LXN*, *NKAPL*, *KLF6*, *DOK2*, *LIMA1*, *LAPTM5*, *XAF1*, *RASSF5*, *TSPYL5* und *RUNX1* (siehe Anhang, Tabelle 9).

Um größere differentiell methylierte Regionen (DMRs) zwischen G1 und G2 ausfindig zu machen, wurde in der Folge der *bumphunter*-Algorithmus, welcher im *minfi* Package implementiert ist, auf die β -Werte angewendet. Dadurch wurden insgesamt 210 DMRs mit einem $fwer < 0,05$ und einer > 500 bp umfassenden Region identifiziert und hinsichtlich ihrer

Sterne repräsentieren signifikante (P -Werte $< 0,05$; Fisher's Exact Test) chromosomale Veränderungen zwischen G1- und G2-Tumoren. Chromosomengewinn ist in grün und Chromosomenverlust in blau dargestellt.

Insgesamt deuten unsere Methylierungsdaten auf die Präsenz zweier epigenetischer Cluster in PLT hin, die sich durch eine globale Hypomethylierung mit CIMP-Eigenschaften, differentieller Methylierung an Leberentwicklungs-Genloci und genomischer Instabilität charakterisieren lassen.

4.1.2 Der epigenetische Fußabdruck und seine prognostischen Implikationen im HB

Um die klinische Relevanz der epigenetischen Subgruppierung beurteilen zu können, wurden die PLT jeweils mit ihrem *CTNNB1*- und *APC*-Mutationsstatus sowie ihren klinischen Parametern wie Gesamtüberleben, Event-freies Überleben, Geschlecht, Diagnosealter, Tumordifferenzierung, Metastasierung, multifokalem Wachstum und dem Tumorstadium nach PRETEXT korreliert.

Die Anwendung des Kaplan-Meier-Schätzers dokumentierte eindrucksvoll den Unterschied im Gesamtüberleben der einzelnen PLT-Entitäten, mit einem besonders drastischen Verlauf bei den MRTs und einem prinzipiell besseren Verlauf bei den HBs (Abb. 7A).

Die separate Betrachtung der HCCs hinsichtlich ihres Methylierungsclusters zeigte dann keine Unterschiede im Gesamtüberleben (Abb. 7B) und ließ auch keine Unterschiede in den weiteren klinischen Parametern erkennen (siehe Anhang, Tabelle 11). Jedoch deutete die Analyse des Gesamtüberlebens bei den HB-Tumoren auf einen medizinisch relevanten Unterschied zwischen dem G1- und G2-Cluster hin, wobei die G2-Gruppe eine deutlich schlechtere Prognose aufwies (Abb. 7C). Konsequenterweise konnte die G2-Gruppe signifikant mit multifokalem Wachstum und Metastasierung assoziiert werden (Abb. 7D, linke Seite), sowie mit der auf der 16-Gen-Signatur basierenden und prognostisch ungünstigen Subgruppe C2 (Abb. 7D, unterer rechter Teil). Diese wurde ursprünglich von Cairo et al. 2008³⁰ publiziert und beschreibt die Nutzung des Expressionsprofils von 16 Genen zur Klassifizierung einer Standardrisikogruppe von C1-Tumoren und einer Hochrisikogruppe von C2-Tumoren. Zusätzlich zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen G1- und G2-HBs beim Vorkommen von Mutationen in Genen des Wnt-Signalweges. So wiesen G1-HBs nur bei 66,7% aller Patienten eine *CTNNB1*-Mutation auf, während G2-HBs in 15/16 Fällen eine *CTNNB1*-Mutation und in einem Fall eine *APC*-Keimbahnmutation aufwiesen (Abb. 7D, oberer rechter Teil), was einer Wnt-Signalwegsaktivierung von 100% entsprach. Zusätzlich ist hier zu bemerken, dass weitere genetische Mutationen in *NFE2L2* und *TERT* (jeweils 2/16) ausschließlich die G2-HBs

4 ERGEBNISSE

betrafen, allerdings aufgrund ihres geringen Vorkommens keine statistische Signifikanz erzielten.

Zusammenfassend spiegeln unsere Daten eine bedeutende prädiktive Rolle des epigenetischen Fußabdruckes wider, welcher für das G2-Cluster einen aggressiven und metastasierten Tumorstatus von HB-Patienten mit kürzerem Gesamtüberleben prognostizierte.

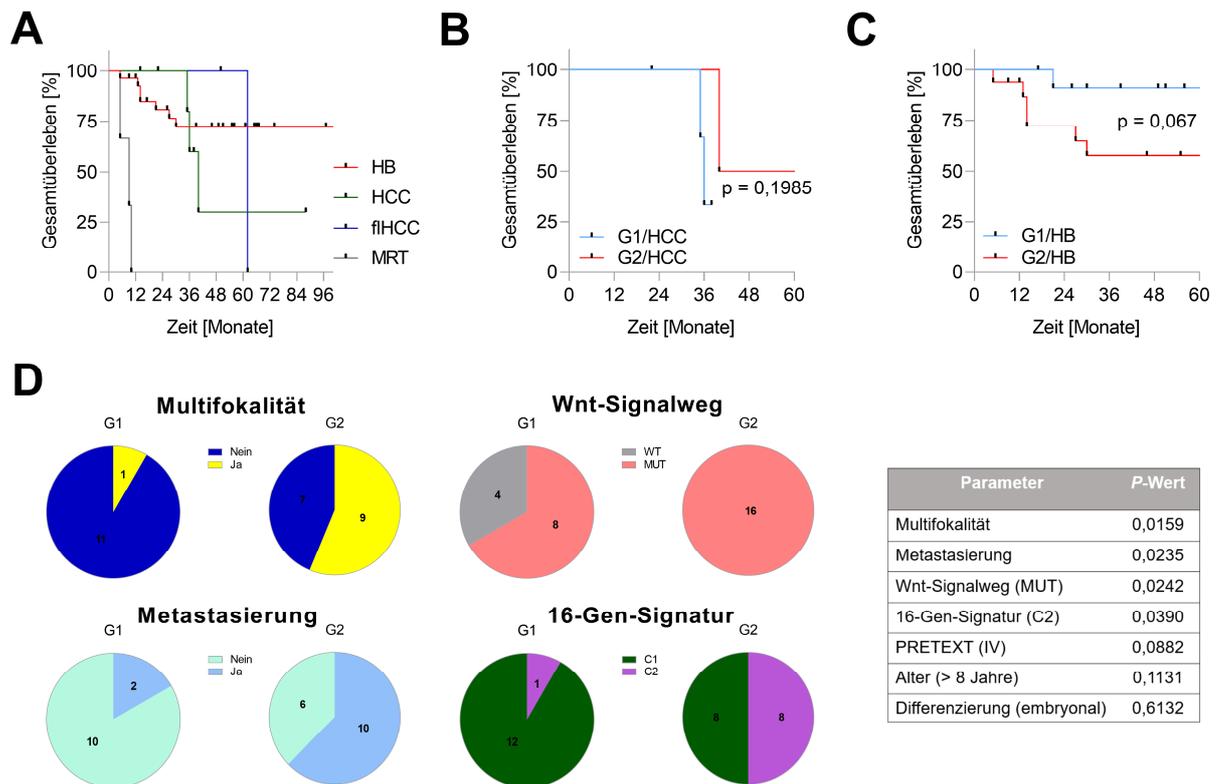


Abbildung 7: Klinische Evaluation des epigenetischen Fußabdruckes kindlicher Lebertumore. Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse des Gesamtüberlebens nach (A) Tumorentität, (B) epigenetischer Gruppierung von HCC-Tumoren und (C) HB-Tumoren. (D) Kreisdiagramm-Darstellung der Patientenanteile pro epigenetischer Gruppe der HB-Tumoren. Dargestellt sind die vier signifikant unterschiedlichen klinischen Parameter Multifokalität, Metastasierung, Aktivierung des Wnt-Signalwegs und C2-Subgruppe der 16-Gen-Signatur. Alle untersuchten klinischen Parameter sind in nebenstehender Tabelle zusammengefasst. Der P-Wert wurde durch Anwendung des *Fisher's Exact Tests* ermittelt. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet.

4.1.3 Globale Genexpressionmuster im HB spiegeln epigenetische Klassifizierung wider

Um einen tieferen Einblick in die transkriptionellen Konsequenzen der veränderten Methylierungsmuster zu gewinnen und Mechanismen ausfindig zu machen, die das Stratifizierungspotential des epigenetischen Fußabdruckes im HB erklären, wurden 11 HBs aus der ursprünglichen Methylierungskohorte zusammen mit 11 unabhängigen NL-Proben einer RNA-Sequenzierung unterzogen. Erstaunlicherweise ergab die Ausführung von t-SNE und

unüberwachtem, hierarchischen Clustering der 3000 variabelsten Gene mit der stärksten Reihenvarianz erneut drei gut separierte Cluster mit den NL-Proben und den zwei HB-Subgruppen, wobei alle 11 HBs die selbe Zuordnung aufwiesen wie beim Methylierungsclustering (Abb. 8A+B).

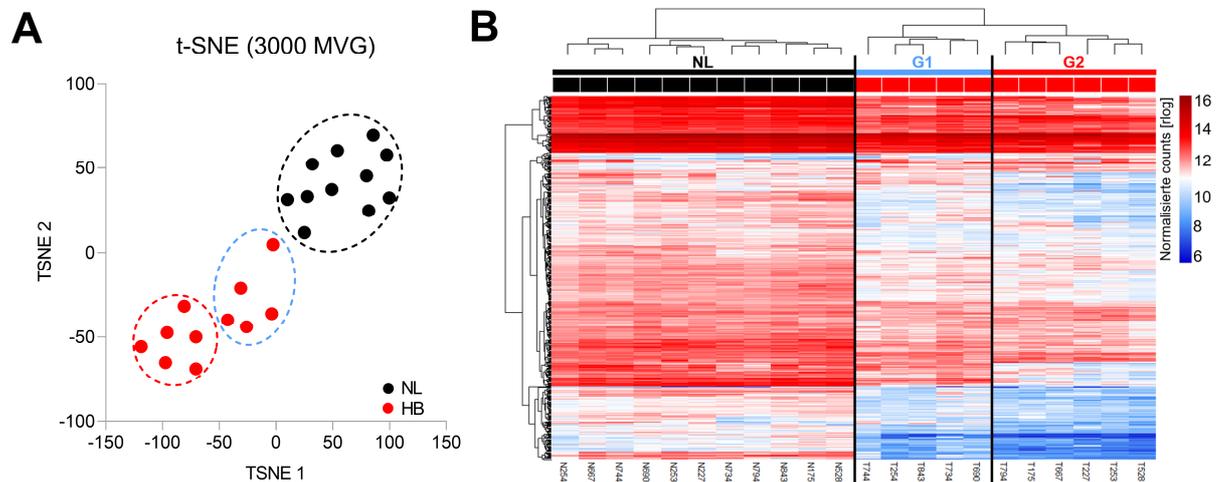


Abbildung 8: Globales Expressionsprofil von HBs. (A) *T-distributed stochastic neighbour embedding*-Analyse der \log -transformierten Expressionswerte der 3000 variabelsten Gene mit der stärksten Reihenvarianz von 11 Normalleberproben (NL; schwarz) und 11 Hepatoblastomen (HB, rot). Epigenetische Cluster sind durch die gestrichelte Umrandung in schwarz für NL, in hellblau für G1 und in rot für G2 markiert. (B) Heatmap-Darstellung des unüberwachten hierarchischen Clusterings der \log -transformierten Expressionswerte der 3000 variabelsten Gene mit entsprechender farbcodierter Gruppenzugehörigkeit in G1 (hellblau), G2 (rot) und NL (schwarz).

Da der epigenetische Fußabdruck von HBs eine starke Assoziation mit der 16-Gen-Signatur zeigte (Abb. 7D), war es naheliegend zunächst die Expressionswerte der entsprechenden 16 Gene aus den Transkriptom-Daten zu extrahieren. In Übereinstimmung mit den klinischen Daten des Methyloms trat eine deutliche Überexpression der C2-Gene *RPL10A*, *E2F5*, *NLE1*, *BUB1*, *IGSF1*, *AFP*, *DUSP9* und *DLG7* in G2-HBs zu Tage, während die C1-Gene *CYP2E1*, *ALDH2*, *APCS*, *HPD*, *C1S*, *GHR*, *APOC4* und *AQP9* eine Herunterregulation in den G2-Tumoren manifestierten. Die Expressionswerte der G1-Gruppe unterschieden sich nur geringfügig von NL (Abb. 9A).

Zusätzlich wurden auch die Gene der 4-Gen-Signatur bestehend aus *HSD17B6*, *ITGA6*, *TOP2A*, und *VIM* näher betrachtet.⁵⁰ Diese wurde erst kürzlich veröffentlicht und sah ebenso eine Risikostratifizierung von Standard-HBs und Hochrisiko-HBs wie die 16-Gen-Signatur vor, zeigte allerdings eine weiterführende Subklassifizierung der C2-Tumore in die stark proliferative Hochrisikogruppe C2A und die mittlere Risikogruppe C2B auf. Auch wir konnten durch den Vergleich der Expressionswerte von *HSD17B6* und *TOP2A* einen Unterschied zwischen G1 und G2 nachweisen, was eine Äquivalenz zur C1- bzw. zur C2A-Gruppe widerspiegelt. *ITGA6* und

VIM hingegen besaßen für unseren Datensatz kein Diskriminierungspotential, weshalb keine entsprechende C2B-Gruppe identifiziert werden konnte (Abb. 9A).

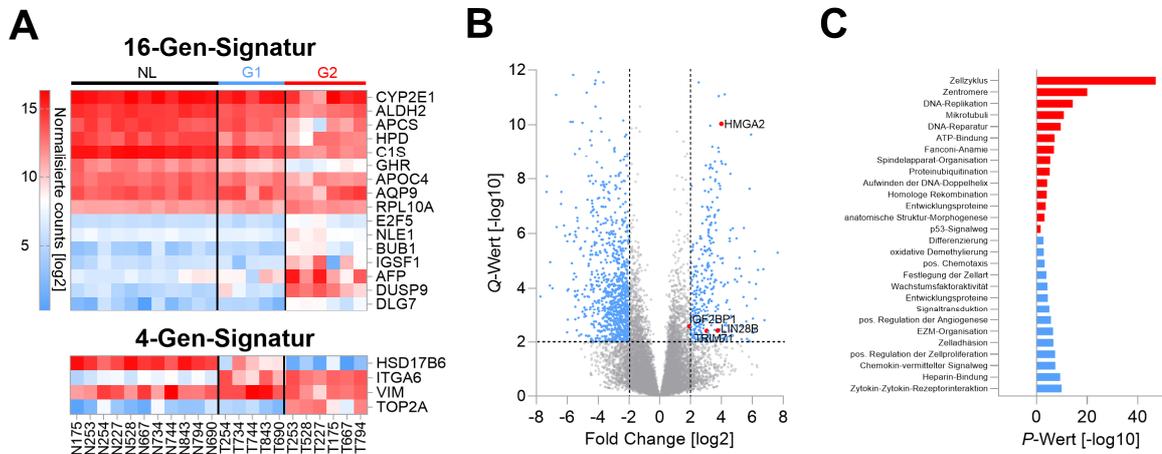


Abbildung 9: Analyse der Transkriptomdaten. (A) Heatmap-Darstellung der log₂-transformierten Expressionswerte der 16-Gen-Signatur (oben) und der 4 Gene der 4-Gen-Signatur (unten) in 11 NL-, 5 G1/HB- und 6 G2/HB-Proben. (B) Streudiagramm der differentiellen Expression von G2/HBs im Vergleich zu G1/HBs. Alle Gene sind mit ihrem log₂-Fold Change auf der X-Achse und dem negativen log₁₀-Q-Wert auf der Y-Achse dargestellt. Gene mit einem absoluten log₂-Fold Change > 2 und einem negativen log₁₀-Q-Wert > 2 sind in hellblau markiert. Gene mit einem absoluten log₂-Fold Change > 2 und einem negativen log₁₀-Q-Wert > 2 sind in rot dargestellt. (C) Ergebnisse der funktionellen Annotation von differentiell exprimierten Genen zwischen G2/HBs und G1/HBs mit einem log₂-Fold Change > 2 und einem negativen log₁₀-Q-Wert > 2.

Die anschließende globale Betrachtung der Genexpressionsmuster zwischen G1 und G2 ergab 1293 differentiell exprimierte Gene (342 hochregulierte und 951 herunterregulierte Gene) mit einem Q-Wert < 0,01 und einem absoluten Fold Change > 4 (Abb. 9B, hellblaue Punkte), die durch funktionelle Annotation mit *DAVID* näher charakterisiert wurden. Eine überproportionale Anreicherung an Zellzyklus-Genen wurde hierbei als Charakteristikum von G2/HBs identifiziert, während G1- und NL-Proben eine vergleichbar geringe Expression in diesen Genen aufwiesen (Abb. 9C + 10A). Weitere Expressionsunterschiede betrafen überwiegend DNA-Reparatur-Gene, welche in G2 hochexprimiert waren (Abb. 9C + 10B), und eine Reihe an Differenzierungs- und Entwicklungsgenen mit einem eher stammzellähnlichen Expressionsprofil in G2 und *vice versa* einem differenzierteren Zellexpressionsprogramm in G1 (Abb. 9C + 10C).

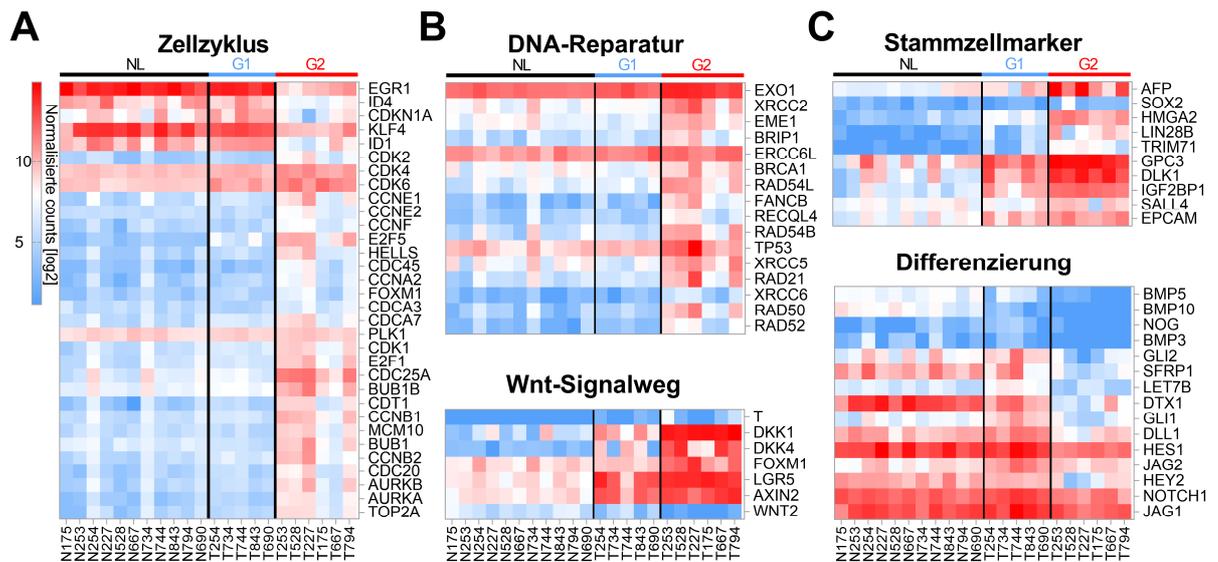
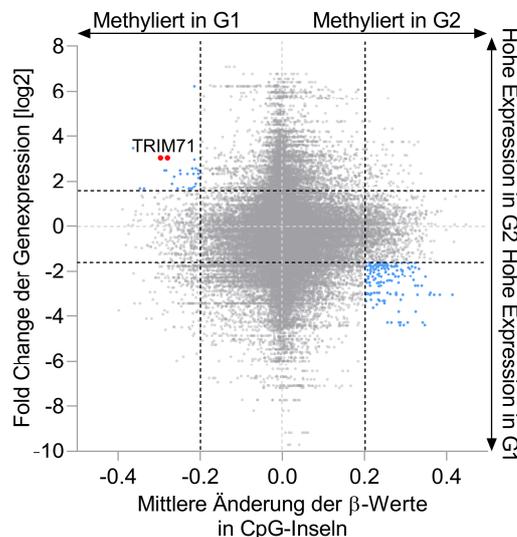


Abbildung 10: Funktionelle Annotation. Heatmap-Darstellung der log₂-transformierten Expressionswerte von (A) Zellzyklus-Genen, (B) DNA-Reparatur-Genen (oben), Wnt-Signalwegs-Genen (unten), (C) Stammzellmarker-Genen (oben) und Differenzierungsgenen (unten) in 11 NL-, 5 G1/HB- und 6 G2/HB-Proben mit entsprechender farbcodierter Gruppenzugehörigkeit in G1 (hellblau), G2 (rot) und NL (schwarz).

4.1.4 Die Integration von Methylom- und Transkriptom-Daten identifiziert das TRIM71-HMGA2-LIN28B-IGF2BP1/3-Netzwerk als Marker des G2-Clusters

In einem nächsten Schritt wurde durch die Überlagerung der Transkriptom-Daten und der korrespondierenden β -Werte von in CpG-Inseln lokalisierten CpGs auf Genebene eine Integration beider Datensätze vorgenommen. Dadurch konnten 83 Gene (15 hochregulierte und 68 herunterregulierte Kandidaten) mit einer absoluten mittleren Methylierungsänderung $> 0,2$, einem absoluten Fold Change der Genexpression > 3 und einer negativen Korrelation der CpG-Insels-Methylierung und RNA-Expression zwischen G1- und G2-HBs identifiziert werden (Abb. 11, blaue Punkte).



4 ERGEBNISSE

Abbildung 11: Integration der Methylom- und Transkriptom-Daten. Streudiagramm aller CpG-Insel-assoziierten CpGs zeigt die Korrelation zwischen der DNA-Methylierung von CpG-Inseln und der RNA-Expression zwischen der G1- und G2-Subgruppe. CpGs mit einer mittleren absoluten Methylierungsänderung $> 0,2$, einem absoluten Fold Change der Genexpression > 3 und einer negativen Korrelation sind in blau dargestellt. Das Kandidatengen *TRIM71* ist in rot dargestellt.

Erwartungsgemäß konnte einem Großteil der stark methylierten, niedrig exprimierten Kandidaten in G2 (Abb. 11, rechter unterer Quadrant) eine Funktion als Tumorsuppressorgen attribuiert werden. Besonders deutlich erwies sich die negative Korrelation von DNA-Methylierung und Genexpression für *TSPYL5*, *TRANK1*, *TUSC1*, *MARVELD1*, *GATA6*, *RASSF1*, *NKAPL* und *SPINT2* (Abb. 12).

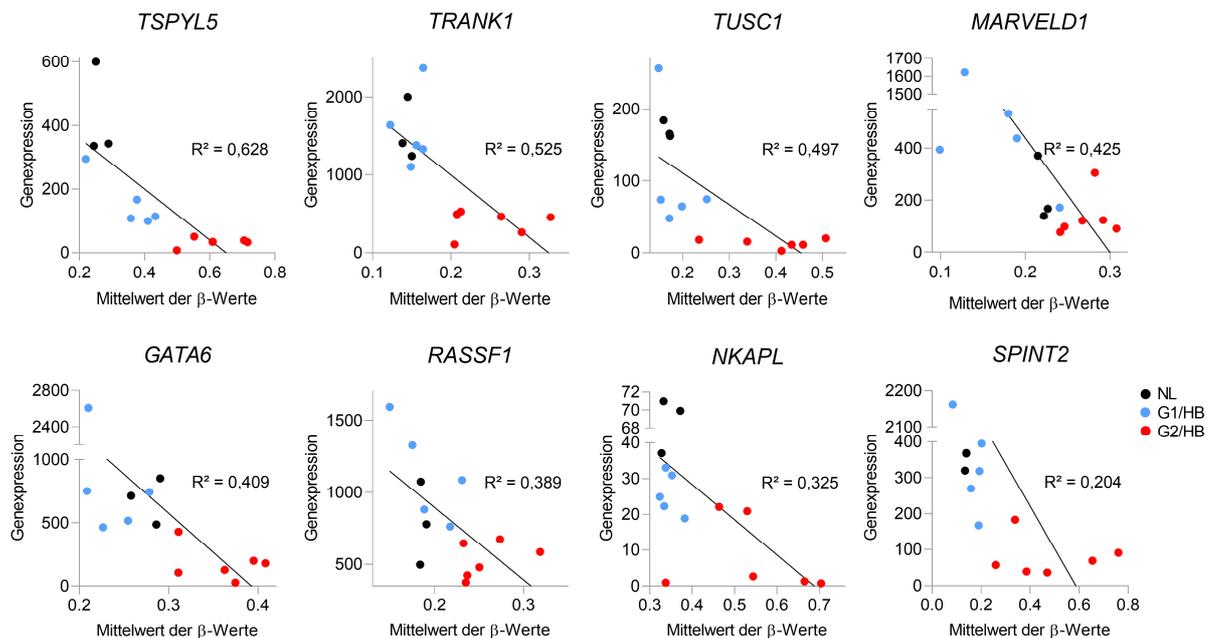


Abbildung 12: Zusammenhang der CpG-Insel-Methylierung und mRNA-Expression in ausgewählten Tumorsuppressorgenen. Punkte repräsentieren den Mittelwert der β -Werte Gen-assoziiierter CpG-Inseln aufgetragen gegen die normalisierten *counts* des entsprechenden Gens pro Probe. Patientenproben sind entsprechend ihrer farbcodierten Gruppenzugehörigkeit in hellblau (G1), rot (G2) und schwarz (NL) dargestellt. R^2 wurde mittels Mantel-Cox-Test ermittelt.

Im Gegensatz dazu zeigten nur wenige Gene eine CpG-Insel-Hypomethylierung in Verbindung mit einer RNA-Überexpression in G2-Tumoren. Da diese möglicherweise durch die Vermittlung onkogener Signale den aggressiveren G2-Tumorphänotyp bedingen, galt diesen besonderes Interesse. Ein Kandidat der dabei deutlich herausstach, war die E3-Ubiquitinligase *TRIM71* mit einer Hypomethylierung von zwei CpGs, die 1640 bp (cg23666945) und 1897 bp (cg04507915) *downstream* des Transkriptionsstarts lokalisiert waren (Abb. 11, rote Punkte).

Eine genaue Betrachtung der genspezifischen Methylierung von *TRIM71* anhand der 450k-Daten legte eine hypomethylierte Region von insgesamt 1680 bp mit einer mittleren Methylierungsänderung von 0,282 (G1: 0,631; G2: 0,349) in G2-HBs offen (Abb.13A). Diese Hypomethylierung in G2 konnte durch die Durchführung der Pyrosequenzierung rund um

4 ERGEBNISSE

cg04507915, cg27195956 und cg24348110 mit 32 PLT- (14 G1 und 18 G2) und 5 NL-Proben als Kontrolle nochmals bestätigt werden und ermöglichte den Einbezug von vier weiteren CpGs *upstream* und *downstream* von cg04507915 und cg27195956 (siehe Anhang, Abb. 30), die ebenso durchwegs signifikante Methylierungsunterschiede zwischen G1 und G2 aufwiesen. Jedoch fielen hierbei die detektierten Methylierungswerte an den CpGs cg27195956 und cg24348110 tendenziell höher aus als im Array-Datensatz (siehe Anhang, Abb. 30).

Die anschließende Überlagerung von Methylierung und Genexpression für *TRIM71* manifestierte eine ausgeprägte inverse Korrelation (Abb.13B) und deutete auf eine starke Relevanz dieses Genabschnitts in der transkriptionellen Kontrolle von *TRIM71* hin, was eine potentielle Erklärung für die Hochregulation der Genexpression von *TRIM71* in G2-Tumoren um das 3,04-fache liefert (Abb.13C).

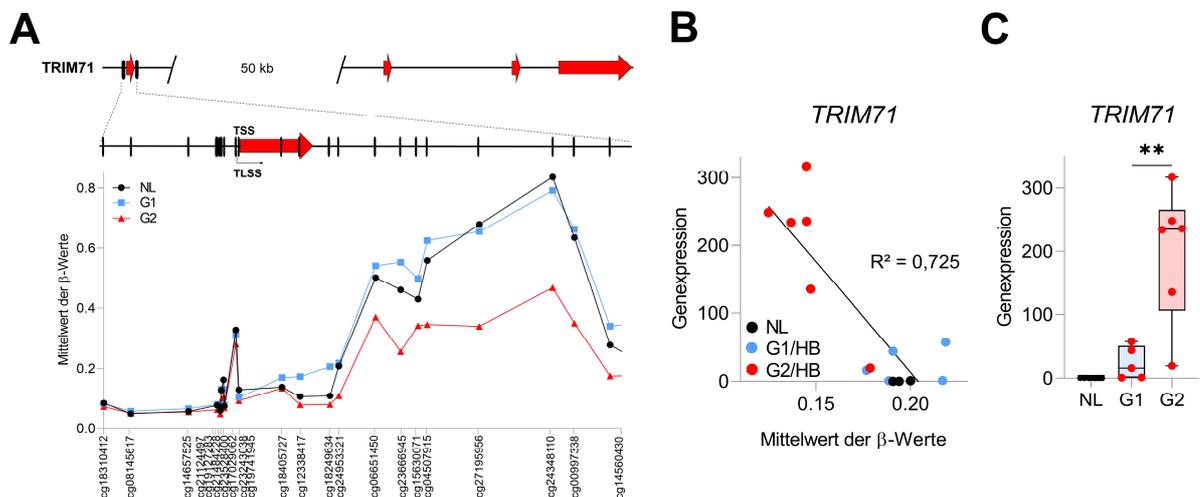


Abbildung 13: Methylierung und Expression am *TRIM71*-Lokus. (A) Schematische Abbildung des *TRIM71*-Lokus und der durch die 450k-Array-Methodik erfassten CpGs rund um Exon 1 von *TRIM71*. Der Mittelwert der β -Werte pro CpG wurde für die epigenetischen Cluster NL (schwarz), G1 (hellblau) und G2 (rot) separat bestimmt und anhand der Distanz zu cg18310412 aufgetragen. Rote Pfeile stellen Exon 1 bis Exon 4 dar. Schwarze Striche spiegeln die Lage des entsprechenden CpGs wider. (B) Punkte repräsentieren den Mittelwert der β -Werte der *TRIM71*-assoziierten CpG-Inseln aufgetragen gegen die normalisierten *counts* von *TRIM71* pro Patientenprobe mit NL-Proben in schwarz, G1/HBs in hellblau und G2/HBs in rot. R^2 wurde mittels Mantel-Cox-Test ermittelt. (C) Boxplot-Darstellung der normalisierten *counts* von *TRIM71* pro Patientenprobe kategorisiert nach den epigenetischen Clustern NL (schwarz), G1 (hellblau) und G2 (rot). Schwarze Punkte manifestieren NL-Proben, rote Punkte manifestieren HB-Proben.

Um Gene mit ähnlichem Expressionsprofil und damit weitere Akteure im Zusammenhang mit *TRIM71* in G2-Tumoren ausfindig zu machen, sollte die globale Koexpression näher studiert werden. Hierfür wurde durch Ausübung der *TOMsimilarityFromExpr*-Funktion aus dem *WGCNA Package* eine sogenannte *Topological Overlap Matrix* generiert, *TRIM71*-Interaktoren mit einem *Cutoff* von 0,2 extrahiert und als Netzwerk-Datei in Cytoscape visualisiert (Abb. 14). Interessanterweise entfiel ein Großteil koexprimierter Gene auf bekannte Onkogene (*TERT*, *MYCN*, *MYCNOS*, *BIRC5*, *MMP12*, *MMP9*, *E2F1*), Gene der 16- sowie der 4-Gen-Signatur, Zellzyklusgene (*BUB1*, *BUB1B*, *AURKA*, *AURKB*, *CDC20*, *CDC25A/45*, *CDT1*, *CCNA2/B1/F*,

CDK1), Lebertumor-assoziierte Gene (*AFP*, *DLK1*, *GPC3*), DNA-Reparatur-Gene (*BRCA1/2*, *RAD51*, *RAD54L*, *XRCC2*, *NEIL3*) sowie Wnt-Signalwegs-Gene (*DKK1*, *DKK4*, *FOXM1*, *WNT11*) (Abb. 14).

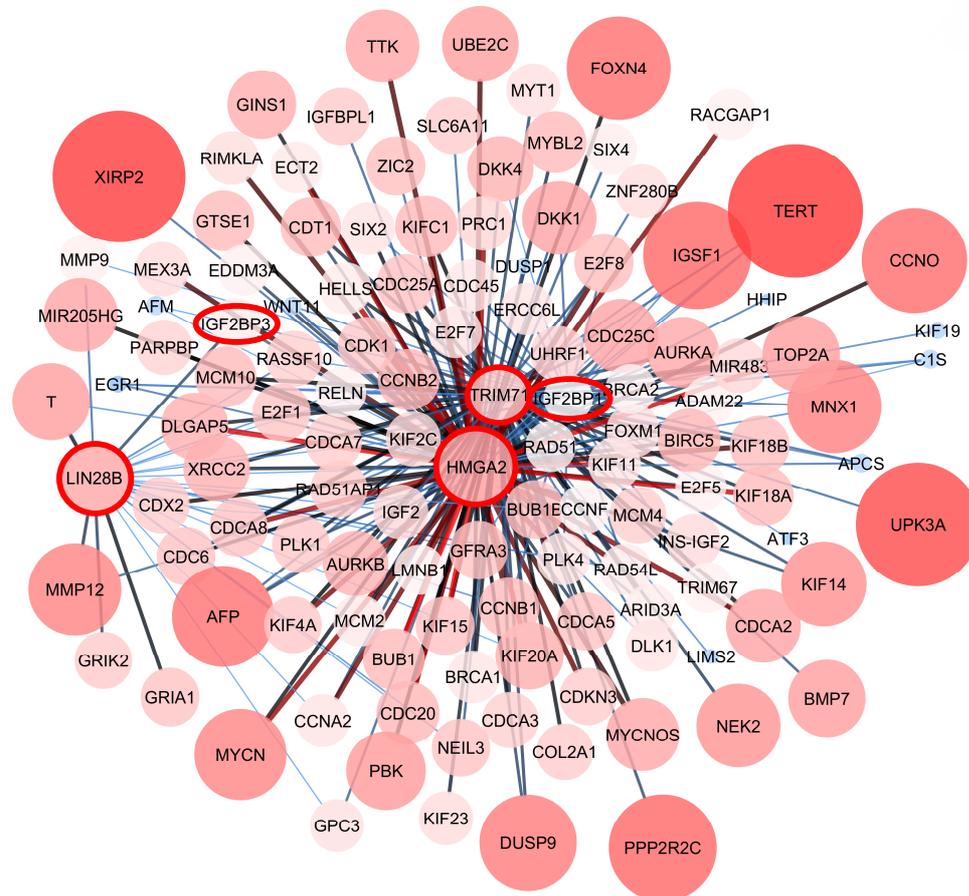


Abbildung 14: Koexpressionsmatrix von *TRIM71*. Visualisierung einer *Topological Overlap Matrix* mit Cytoscape. Kreisgröße und -farbe codieren den \log_2 -Fold Change der Expression in G2-Tumoren, wobei Zunahme an Größe und Farbintensität eine stärkere Expression widerspiegelt. Die dicke der Verbindungsstriche dokumentiert die Ausprägung der Koexpression, wobei breite Verbindungslinien eine ausgeprägtere Koexpression visualisieren. Das onkogene Dreieck *HMGA2-LIN28B-IGF2BP1/3*, sowie *TRIM71* sind durch eine rote Einrahmung hervorgehoben.

Äußerst auffällig war die Präsenz des als onkogenes Dreieck bekanntes, sich selbstverstärkendes Netzwerk *HMGA2-LIN28B-IGF2BP1/3* (Abb. 14, rote Umrandung),¹⁴¹ die alle eine starke Überexpression um das 15,9-, 14-, 3,6- bzw. 4,8-fache in der G2-Gruppe verglichen zu G1-HBs aufwiesen (Abb. 15A). Eine weiterführende Untersuchung der Expression von *TRIM71*, *HMGA2*, *LIN28B* und *IGF2BP1* in 36 Tumorproben und 10 NL-Proben mittels RT-Q-PCR durch meine Kollegin Ting Jiang (Daten aus entsprechender Doktorarbeit entnommen) zeigte eine deutliche Korrelation dieser vier Gene (Abb. 15B), untermauerte damit die Gültigkeit der berechneten *Similarity Matrix* und führte *TRIM71* als potentielles, wichtiges Mitglied des onkogenen Netzwerkes in aggressiven G2-Tumoren ins Feld.

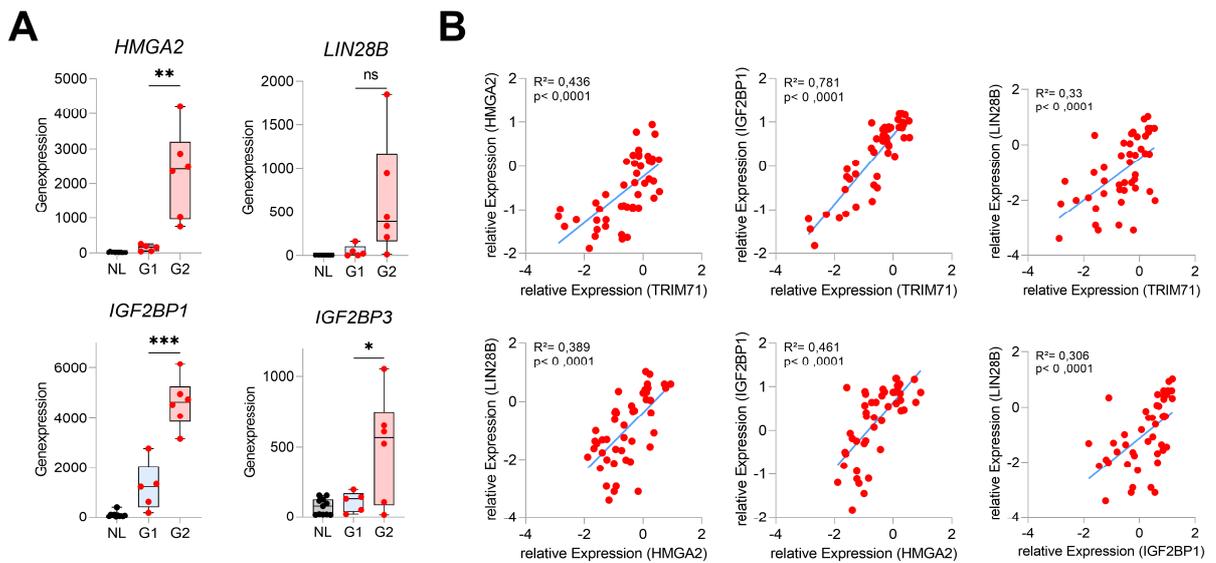


Abbildung 15: Untersuchung der Koexpression von *TRIM71* mit dem onkogenen Dreieck *HMGA2*-*LIN28B*-*IGF2BP1/3*. (A) Boxplot-Darstellung der normalisierten counts von *HMGA2*, *LIN28B*, *IGF2BP1* und *IGF2BP3* pro Patientenprobe kategorisiert nach den epigenetischen Clustern NL (schwarz), G1 (hellblau) und G2 (rot). Schwarze Punkte manifestieren NL-Proben, rote Punkte manifestieren HB-Proben. (B) Korrelation der relativen Expression von *TRIM71* mit *HMGA2*, *IGF2BP1*, *LIN28B*, von *HMGA2* mit *LIN28B* und *IGF2BP1* und von *IGF2BP1* mit *LIN28B*. Relative Expression wurde durch meine Kollegin Ting Jiang mittels RT-Q-PCR bestimmt und mit dem *Housekeeping*-Gen *TBP* normalisiert. R^2 wurde mittels Mantel-Cox-Test ermittelt.

4.1.5 *TRIM71* fördert die proliferativen und selbsterneuernden Eigenschaften von Hepatomzelllinien

Um das onkogene Potential von *TRIM71* in Leberkrebszellen zu untersuchen, wurden *Gain*- und *Loss-of-function*-Studien in den vier Hepatomzelllinien HepT1, Hep3B, HUH6 und HUH7 durchgeführt, die entweder eine hohe (HUH6, HUH7) oder niedrige (HepT1, Hep3B) endogene *TRIM71*-Expression aufweisen. Die transiente Überexpression der mit einem FLAG-Tag versehenen *TRIM71* cDNA in HepT1 und Hep3B führte zu einer robusten *TRIM71*-Expression auf RNA- und Protein-Ebene (Abb. 16A+C), während der siRNA-vermittelte Knock-down gegen *TRIM71* in einer signifikanten Reduktion der Expression um bis zu 66% resultierte (Abb. 16B+D). Der Nachweis der erfolgreichen Überexpression und des Knock-downs auf Proteinebene erfolgte durch meine Kollegin Ting Jiang mittels Western Blot und ist entsprechender Doktorarbeit entnommen (Abb. 16C+D). Zur Untersuchung der proliferativen Eigenschaften sowie der Selbsterneuerungskapazität wurde der MTT-Assay und der klonogene Assay nach *TRIM71*-Modulation durchgeführt und mit Kontroll-transfizierten Zellen verglichen. Es zeigte sich eine signifikante Änderung des proliferativen Verhaltens in HepT1-, HUH6- und HUH7-Zellen, bei welchem die *TRIM71*-Überexpression die Proliferation von HepT1-Zellen positiv beeinflusste (Abb. 16E, links) und der *TRIM71*-Knock-down einen Rückgang der Proliferationsrate in HUH6 und HUH7 bewirkte (Abb. 16F). Die Proliferation von Hep3B-Zellen blieb unbeeinträchtigt (Abb.

4 ERGEBNISSE

16E, rechts). Passend dazu ließ auch die Selbsterneuerungskapazität, welche erneut durch meine Kollegin Ting Jiang bestimmt wurde, einen Anstieg der koloniebildenden Einheiten in HepT1 und Hep3B nach TRIM71-Überexpression erkennen und konnte durch den *TRIM71*-Knock-down in HUH6- und HUH7-Zellen mit einem Rückgang von 63% bzw. 73% umgekehrt werden (Abb. 16G+H).

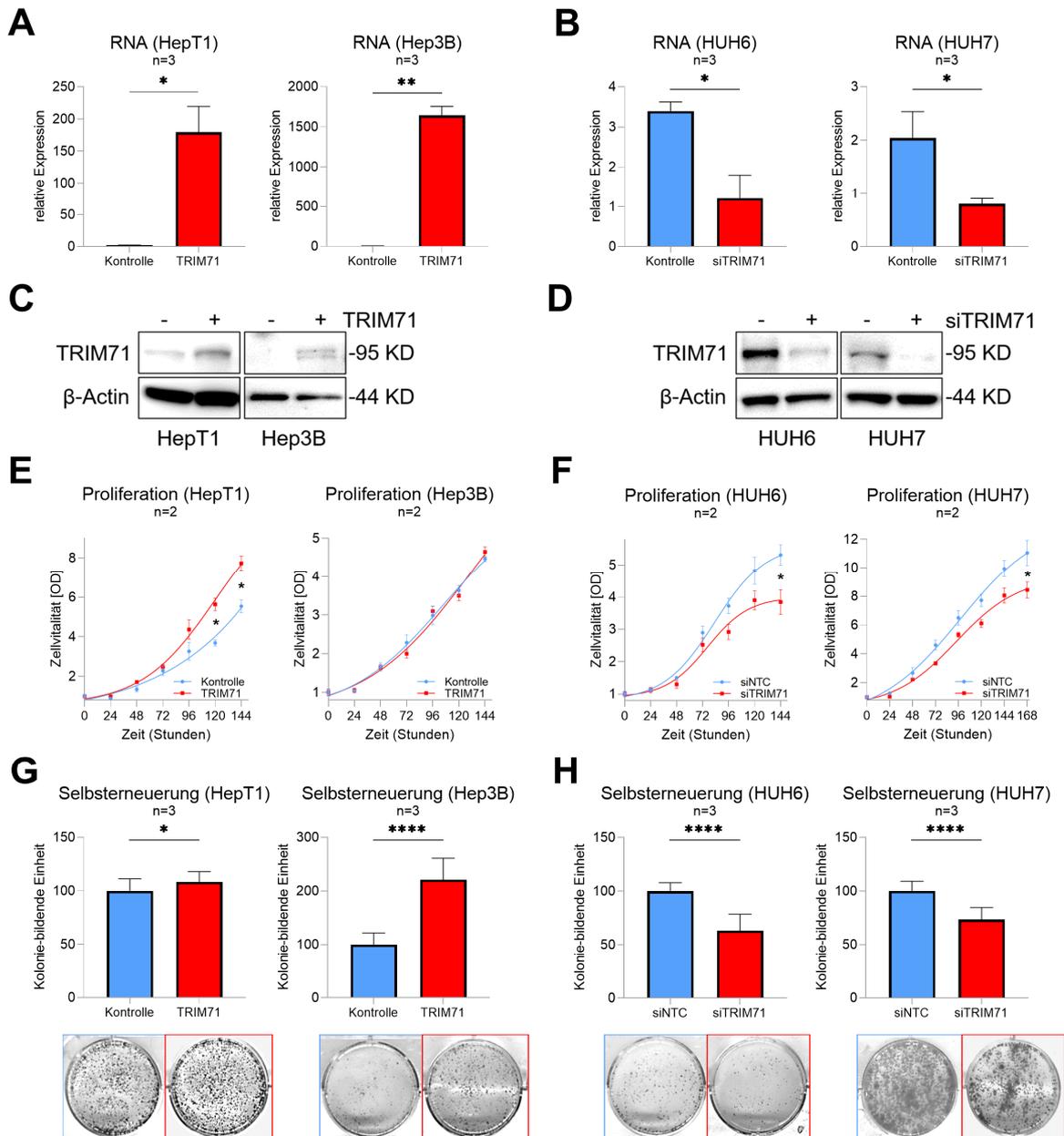


Abbildung 16: Gain- und Loss-of-function-Studien in den vier Hepatomzelllinien HepT1, Hep3B, HUH6 und HUH7 nach der Transfektion mit einerseits (A, C, E, G) dem leeren Kontrollvektor pEGFP-N1 (Kontrolle) und dem *TRIM71* cDNA-enthaltenden Expressionsvektor (TRIM71), oder andererseits (B, D, F, H) nach Transfektion der ungerichteten Kontroll-siRNA (siNTC) und der gegen *TRIM71* gerichteten siRNA (siTRIM71). (A, B) Die *TRIM71*-Expression wurde 24 h nach der Transfektion mittels RT-Q-PCR ermittelt und mit dem *Housekeeping*-Gen *TBP* normalisiert. (C, D) Detektion der *TRIM71*-Protein-Werte in den entsprechenden Zelllinien erfolgte 48 h nach Transfektion mittels Western Blot. Die

Immundetektion von β -Actin wurde zur Standardisierung der Proteinmenge genutzt. Angegebene Bilder stellen repräsentative Beispiele dar. (E, F) Die Zellproliferation wurde an den angegebenen Zeitpunkten mittels MTT-Assay ermittelt. (G, H) Die Selbsterneuerungskapazität wurde durch Auszählung der Kolonien 10 Tage nach Transfektion bestimmt. Angegebene Bilder unter dem Graphen stellen repräsentative Beispiele der Ergebnisse aus dem Assay dar. Der Mittelwert \pm SEM wurde aus der angegebenen Anzahl an Experimenten berechnet. Die statistische Signifikanz ergab sich durch Anwendung des *Student's t-Tests* (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Da die Aktivierung des Wnt-Signalweges als ein Hauptunterschied zwischen den Clustern G1 und G2 festgestellt werden konnte (Abschnitt 4.1.2, Abb. 7), stellten wir die Hypothese auf, dass TRIM71 sein onkogenes Potential durch Beeinflussung des Wnt-Signalweges ausübt. Zur Analyse dessen wurde zunächst der Super TOP/FOP-Reporter-Luciferase Assay in den vier Hepatomzellen HepT1, Hep3B, HUH6 und HUH7 144 h nach TRIM71-Modulation durchgeführt. Hierzu muss angeführt werden, dass HepT1 und HUH6 mit einer Deletion von 76 Aminosäuren in Exon 3 bzw. einer Punktmutation T41A ein mutiertes *CTNNB1*-Gen aufweisen, was zu einem aktiven Wnt-Signalweg in diesen Zelllinien führt. In Übereinstimmung damit fanden wir eine deutliche Aktivierung des Wnt-Signalweges bereits in Kontroll-transfizierten Zellen, was durch TRIM71-Überexpression in HepT1 noch geringfügig verstärkt werden konnte (Abb. 17A, links), beziehungsweise durch *TRIM71*-Knock-down in HUH6-Zellen eine dramatische Reduktion der Wnt-Signalwegs-Aktivierung nach sich zog (Abb. 17B, links). Im Gegensatz dazu ließ sich auch durch TRIM71-Modulation keine Änderung des Wnt-Signalweges in den beiden *CTNNB1*-unmutierten Zelllinien Hep3B und HUH7 nachweisen (Abb. 17A+B, rechts). Da durch Mutationen in *CTNNB1* das β -Catenin-Protein nicht mehr abgebaut werden kann, demzufolge im Zytoplasma akkumuliert und anschließend in den Zellkern wandern kann, wurde die Proteinmenge 144 h nach TRIM71-Modulation in separaten zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen bestimmt (Abb. 17C+D). Die Ergebnisse aus dem Luciferase Assay untermauernd, zeigte sich ein deutlicher Rückgang der β -Catenin-Menge lediglich in der nukleären Fraktion von HUH6-Zellen nach dem *TRIM71*-Knock-down (Abb. 17D, NF), während die zytoplasmatische Fraktion äquivalente Proteinmengen zwischen Kontrolle und Knock-down aufwies. Alle anderen Zelllinien ließen sowohl keine Änderung in der Menge des zytoplasmatischen als auch in der Menge des nukleären β -Catenins erkennen (Abb. 17C+D, ZF).

Da nukleäres β -Catenin in der Folge die Anschaltung der Expression von Zielgenen wie *AXIN2*, *CCND1*, *DKK1* und *LGR5* bedingt, sollten deren Expressionswerte durch RT-Q-PCR detektiert werden. Erneut war eine signifikante Herunterregulation von *AXIN2* und *CCND1* lediglich in HUH6-Zellen 48 h nach dem *TRIM71*-Knock-down messbar (Abb. 17F, links). Dieser Trend zeichnete sich auch für *DKK1* und *LGR5* ab, blieb hier aber knapp über dem Signifikanzniveau (Abb. 17F, links). In HepT1, Hep3B und HUH7 Zellen konnte keine signifikante Expressionsänderung festgestellt werden (Abb. 17E+F, rechts) und bestätigte damit die negativen Ergebnisse aus dem Luciferase Assay und Western Blot.

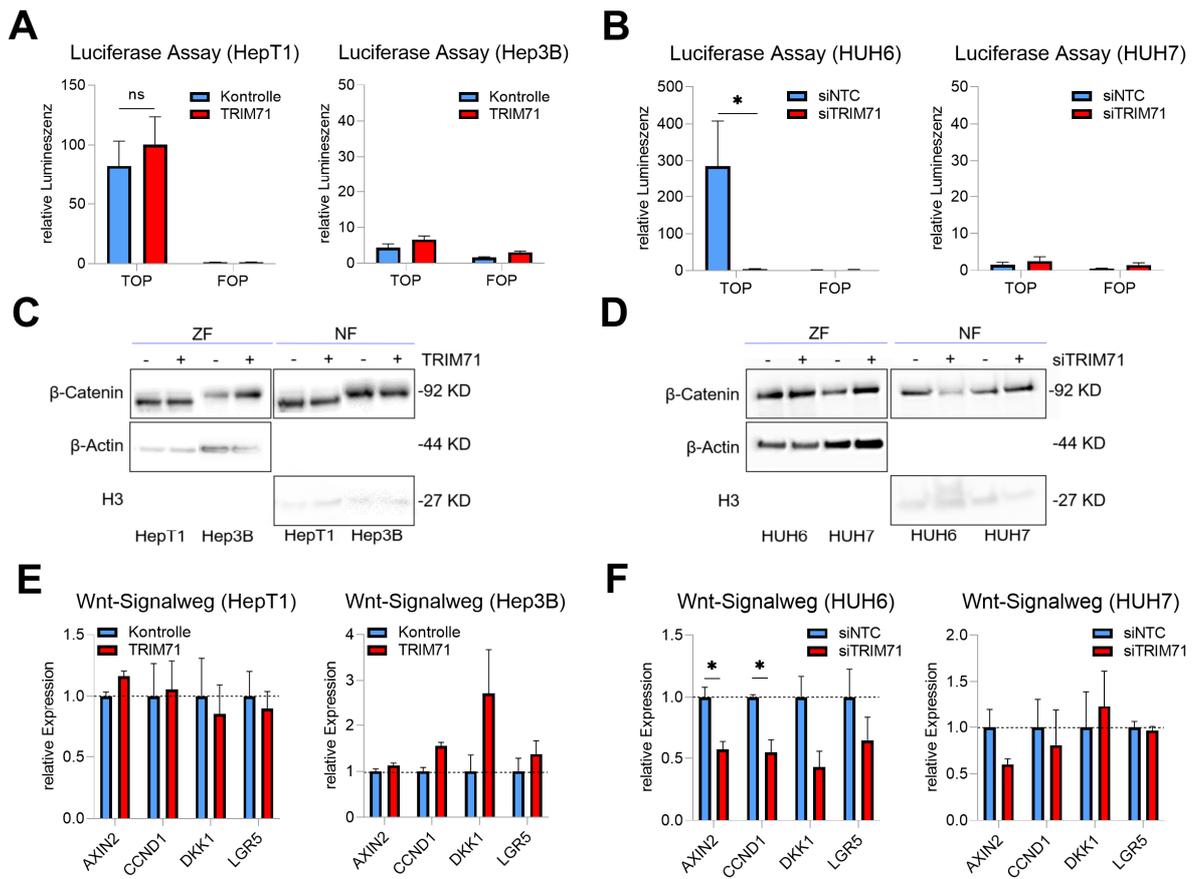


Abbildung 17: Überprüfung der Wnt-Signalwegsaktivierung nach TRIM71-Modulation durch Transfektion mit einerseits (A, C, E) dem leeren Kontrollvektor pEGFP-N1 (Kontrolle) und dem *TRIM71* cDNA-enthaltenden Expressionsvektor (TRIM71), oder andererseits (B, D, F) nach Transfektion der ungerichteten Kontroll-siRNA (siNTC) und der gegen *TRIM71* gerichteten siRNA (siTRIM71). (A, B) Ergebnisse des Luciferase Assays 144 h nach TRIM71-Modulation und 48 h nach der Transfektion mit den Reporterplasmiden pTOP bzw. pFOP. (C, D) Separate Detektion der β -Catenin-Protein-Werte in der zytoplasmatischen (ZF) bzw. nukleären Zellfraktion (NF) 144 h nach TRIM71-Modulation mittels Western Blot. Die Immundetektion von β -Actin (ZF) bzw. H3 (NF) wurde zur Standardisierung der Proteinmenge und Kontrolle der angereicherten Fraktion genutzt. Angegebene Bilder stellen repräsentative Beispiele dar. (E, F) Die relative Expression von *AXIN2*, *CCND1*, *DKK1*, *LGR5* 96 h nach TRIM71-Modulation wurde mittels RT-Q-PCR bestimmt und gegen das *Housekeeping*-Gen *TBP* normalisiert.

4.2 miR-483 als prädiktiver Marker des Gesamtüberlebens in HB-Patienten

Zahlreiche Studien der letzten Jahrzehnte konnten neben den genregulatorischen Funktionen von miRs, deren Nützlichkeit als diagnostisches und therapeutisches Tool in der Onkologie nachweisen.¹⁴² Im HB konnte Cairo et al. 2010 zeigen, dass die Expressionsanalyse einer vier-miR-Signatur aus miR-371, miR-373, miR-100 und let7a eine Einschätzung zum Gesamtüberleben erlaubt.⁵² Sowohl die Validierung der vier-miR-Signatur in einer unabhängigen Patientenkohorte als auch die Identifizierung weiterer prognostischer miRs standen in den letzten Jahren jedoch aus.

4.2.1 Evaluation der vier-miR-Signatur in einer unabhängigen Patientenpopulation

Um eine Beurteilung der vier-miR-Signatur hinsichtlich ihres Risikostratifizierungspotentials vornehmen zu können, wurde das Expressionsprofil von let7a, miR-100, miR-371 und miR-373 in 29 Patientenproben und 10 Normalleberproben analysiert.

Dabei konnte für let7a und miR-100 kein Unterschied in den Expressionwerten von NL- und HB-Gewebe gefunden werden (Abb. 18A+B), allerdings ließ sich eine leichte Korrelation der beiden miRs ausmachen (Abb. 18C). Im Gegensatz dazu zeigten die Expressionswerte der beiden miRs miR-371 (Abb. 18D) und miR-373 (Abb. 18E) eine signifikante Überexpression in HB-Proben im Vergleich zu NL und eine starke Korrelation der Expressionswerte (Abb. 18F).

Basierend auf dem Expressionsprofil der 4 miRs wurden die Tumorproben in die zwei Gruppen Cm1 oder Cm2 entsprechend Cairo et al. 2010 eingeteilt.⁵² Allerdings manifestierte die Anwendung des Kaplan-Meier-Schätzers keinen Überlebensunterschied von Cm1 zu Cm2 (Abb. 18G). Ebenso zeigten die beiden Gruppen Cm1 und Cm2 keine signifikanten Unterschiede, wenn sie entsprechend ihrer klinischen Parameter wie Diagnosealter > 5 Jahre, Gefäßinvasion, Histologie, PRETEXT IV, extrahepatisches Wachstum, Metastasierung und Multifokalität verglichen wurden (Abb. 18H). Wenig überraschend war es, dass die vier-miR-Signatur signifikant mit der 16-Gen-Signatur assoziiert werden konnte, von welcher sie ursprünglich abgeleitet wurde.³⁰

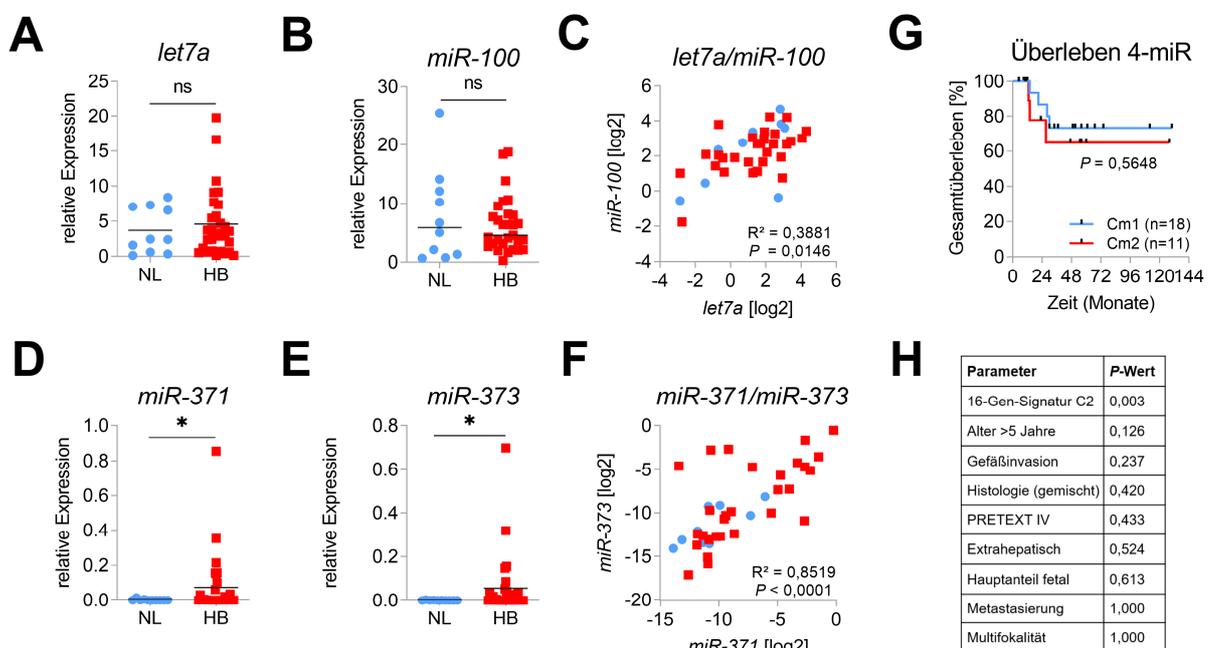


Abbildung 18: Relative Expression von (A) let7a, (B) miR-100, (D) miR-371, and (E) miR-373 in Normalleber- (NL) und Lebertumor-Proben, bestimmt anhand RT-Q-PCR und normalisiert mit der Expression der *Housekeeping*-miR RNU43. Die Signifikanz wurde durch den ungepaarten *t*-Test mit Welch's Korrektur berechnet, der entsprechende *P*-Wert ist angegeben. (C+F) Korrelation der log2-transformierten Expressionswerte von (C) let7a und miR-100 und (F) miR-371 und miR-373, welche mit der Spearman R Korrelation berechnet wurde. Blaue Punkte entsprechen den NL-

Proben und rote Quadrate den HB-Proben. (G) Gesamtüberleben der Patienten mit Lebertumoren stratifiziert entsprechend ihres 4-miR-Expressionsprofils in Cm1 oder Cm2. (H) Assoziationsstudie der vier-miR-Signatur mit klinischen Parametern unter Verwendung des Fisher's Exact Tests und Angabe der entsprechenden *P*-Werte.

4.2.2 Verbesserte Risikostratifizierung durch Integration von miR-483 in die vier-miR-Signatur

Im nächsten Schritt sollte die Expression von miR-483 im HB studiert werden. miR-483, welche durch das *MIR483*-Gen auf Chromosom 11p15.5 im zweiten Intron des *IGF2*-Gens codiert wird, galt besonders durch seine positive Regulation der *IGF2*-Expression¹⁰⁹ als auch aufgrund seiner erst kürzlich identifizierten Implikationen im Wnt-Signalweg^{110, 143} – zwei zentrale Mechanismen der Hepatoblastomentwicklung – als äußerst vielversprechender Kandidat. Durch die identifizierte Überexpression von miR-483 in G2/HBs (siehe Anhang, Abb. 31A) und seiner Koexpression mit bestätigten onkogenen Faktoren (Abb. 14) rückten auch prognostische Implikationen in den Fokus und wurden im Folgenden weiterführend analysiert.

Da miR-483 bisher nicht im HB untersucht wurde, wurde sowohl das 5'- (miR-483-5p) als auch das 3'-Transkript (miR-483-3p) gemessen. Die Expressionsanalyse ergab signifikant erhöhte Werte von miR-483-5p in Tumorproben verglichen zu NL (Abb. 19A). Auch miR-483-3p verzeichnete einen ähnlichen Trend, welcher aber knapp über dem Signifikanzniveau blieb (Abb. 19B). Erneut zeigte sich eine starke und hoch-signifikante Korrelation beider Transkriptvarianten (Abb. 19C).

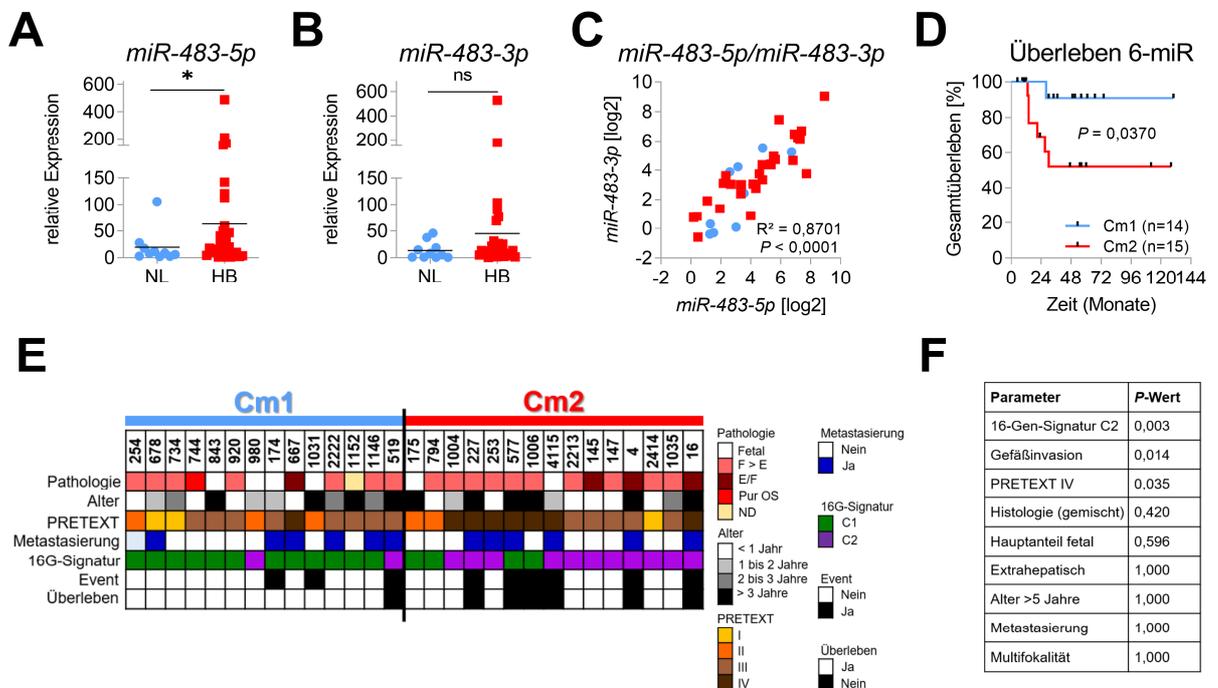


Abbildung 19: Relative Expression von (A) miR-483-3p und (B) miR-483-5p in Normalleber- (NL) und Lebertumor-Proben, bestimmt anhand RT-Q-PCR und normalisiert mit der Expression der *Housekeeping*-miR RNU43. Die Signifikanz wurde durch ungepaarten *t*-Test mit Welch's Korrektur berechnet, der entsprechende *P*-Wert ist angegeben. (C) Korrelation der log2-transformierten Expressionswerte von miR-483-3p und miR-483-5p, welche mit

der Spearman R Korrelation berechnet wurde. Blaue Punkte entsprechen den NL-Proben und rote Quadrate den HB-Proben. (D) Gesamtüberleben der Patienten mit Lebertumoren stratifiziert entsprechend ihres 6-miR-Expressionsprofils in Cm1 oder Cm2. (E) Farbcodierung der klinisch-pathologischen Parameter in Säulenform für 29 HBs. (F) Assoziationsstudie der sechs-miR-Signatur mit klinisch-pathologischen Parametern, berechnet durch den *Fisher's Exact Test* unter Angabe der *P*-Werte.

Eines der Hauptresultate von Cairo et al.⁵² war es, dass die vier-miR-Signatur eine prädiktive Aussage zum Patientenüberleben ermöglichte. Da wir dies in unserem Patientenkollektiv nicht reproduzieren konnten (Abb. 18G), wurde versucht eine Verbesserung des Stratifizierungspotentials durch Integration der beiden miR-483-Transkripte in die vier-miR-Signatur zu erzielen. Dadurch änderte sich die Zuordnung in Cm1 (n=14) und Cm2 (n=15) erheblich und ergab in der Kaplan-Meier-Analyse zwei deutlich differenzierbare Gruppen mit einem signifikanten Unterschied im Patientenüberleben (Abb. 19D). Ebenso zeigte eine Untersuchung der sechs-miR-Signatur anhand klinischer Parameter (Abb. 19E) signifikante Assoziationen mit der 16-Gen-Signatur, der Gefäßinvasion und dem Tumorstadium PRETEXT IV (Abb. 19F).

4.3 Die SP8-FGF8-Achse als prognostischer Faktor in metastasierten HBs mit schlechter Prognose

Metastasierung gilt als die Hauptursache für tumorbedingte Sterblichkeit und ist für etwa 90% der Todesfälle verantwortlich.⁶² Auch für kindliche Lebertumoren konnte dies durch die Studie der *Children's Hepatic Tumors International Collaboration* erst kürzlich bestätigt werden. Diese analysierte weltweit die klinischen Daten von insgesamt 1605 Hepatoblastomfällen⁶⁰ und identifizierte insbesondere die Metastasierung neben einem niedrigen AFP-Wert (< 100 ng/ml) und fortgeschrittenem Kindesalter (> 8 Jahre) als Faktor mit der schlechtesten Überlebenschance.⁶¹ Bessere Kenntnisse der molekularen Mechanismen, die zur Metastasierung im HB führen, würden zur Optimierung und Individualisierung des Patientenmanagements anhand ihres Risikoprofils beitragen und eine frühere Detektion von Metastasen erwirken. Die niedrige Inzidenz dieser Tumorentität limitiert die Datenlage jedoch deutlich, weshalb sich bis dato nur wenige Studien mit der Metastasierung im HB befassen konnten, und macht dies in der Folge umso dringlicher.

4.3.1 Das transkriptionelle Profil von metastasierten HBs unterscheidet sich von Standard-HBs

Für maligne Tumore startet der Weg zur Metastasierung bereits sehr früh und führt im ersten Schritt zur Translokation von Krebszellen, die invasive und motile Charakteristika erlangen konnten.¹⁴⁴ Um dies zu ermöglichen, sind zahlreiche Umbaumaßnahmen in der Zelle nötig, die mit einem veränderten Expressionsprofil einhergehen. Daher wurde zunächst das

Abbildung 20: (A) Hauptkomponentenanalyse von 10 Normalleberproben (NL, in schwarz), 4 metastasierten (M+, in rot), 7 nicht-metastasierten (M-, in blau) Hepatoblastomen und 4 Zelllinien (ZL, in grau). (B) Streudiagramm der differentiell exprimierten Gene zwischen M+ und M- Tumoren. Jedes Gen ist mit seinem log₂-Fold Change auf der X-Achse und seinem negativen log₁₀-P-Wert auf der Y-Achse dargestellt. Gene, welche einen absoluten log₂-Fold Change > 4 und einen P-Wert < 0,0001 aufweisen, sind blau gefärbt. *NQO1*, *SP8* und *FGF8* sind rot eingefärbt. (C) Streudiagramm der Überlagerung von Methylom- und Transkriptom-Daten. Jedes CpG ist mit seinem log₂-Fold Change in der Methylierung auf der X-Achse und seinem log₂-Fold Change der Genexpression zwischen M+ und M- auf der Y-Achse dargestellt. CpGs, welche einen absoluten log-Fold Change > 1,5 der Methylierung und einen log₂-Fold Change > 4 der Genexpression aufweisen, sind blau gefärbt. *NQO1*, *SP8* und *FGF8* sind rot eingefärbt.

4.3.2 *SP8* ist ein überexprimierter Faktor in metastasierten HBs mit schlechter Prognose und korreliert mit *FGF8*

Um zu evaluieren, ob die beiden neuen Kandidaten *SP8* und *FGF8* klinische Relevanz besitzen, wurde das Genexpressionsprofil beider Gene in einer größeren Kohorte von 35 HB-Proben und 11 korrespondierenden Normallebern mittels RT-Q-PCR ermittelt und die Patienten entsprechend ihrer klinischen Parameter wie Geschlecht, Diagnosealter, Tumordifferenzierung, Metastasierung, Überleben, Multifokalität und vaskuläre Invasion gruppiert. Hierbei konnten wir nicht nur zeigen, dass die mRNA-Werte von *SP8* in HB-Proben im Vergleich zu NL-Proben deutlich erhöht waren (Abb. 21A, erster Graph von links), sondern auch die Ergebnisse aus der RNA-Sequenzierung reproduzieren und zeigen, dass eine hohe *SP8*-Expression signifikant mit der Metastasierung im Zusammenhang steht (Abb. 21A, zweiter Graph von links). Zusätzlich dazu konnte die *SP8*-Überexpression auch mit dem aggressiven, unreifen C2-Subtyp aus der 16-Gen-Signatur assoziiert werden (Abb. 21A, dritter Graph von links). Des Weiteren konnten die *SP8*-Expressionswerte auch zu einer signifikanten Abschätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit herangezogen werden, wobei hohe Werte auf eine schlechte Prognose hindeuteten (Abb. 21A, vierter Graph von links).

Die Analyse der klinischen Relevanz von *FGF8* ergab äquivalente Ergebnisse. Die *FGF8*-Werte waren signifikant erhöht in HB- im Vergleich zu NL-Proben (Abb. 21B, erster Graph von links) und zeigten auch für die Metastasierung (Abb. 21B, zweiter Graph von links) und die 16-Gen-Signatur (Abb. 21B, dritter Graph von links) signifikante Unterschiede. Obwohl die Resultate des Kaplan-Meier-Schätzers leicht über dem Signifikanzniveau blieben, war trotzdem ein Trend zu einem kürzeren 5-Jahresüberleben bei hoher *FGF8*-Expression auszumachen (Abb. 21B, vierter Graph von links). Insgesamt war es nicht überraschend, dass sich eine sehr starke Korrelation zwischen der *SP8*- und *FGF8*-Expression manifestierte (Abb. 21C).

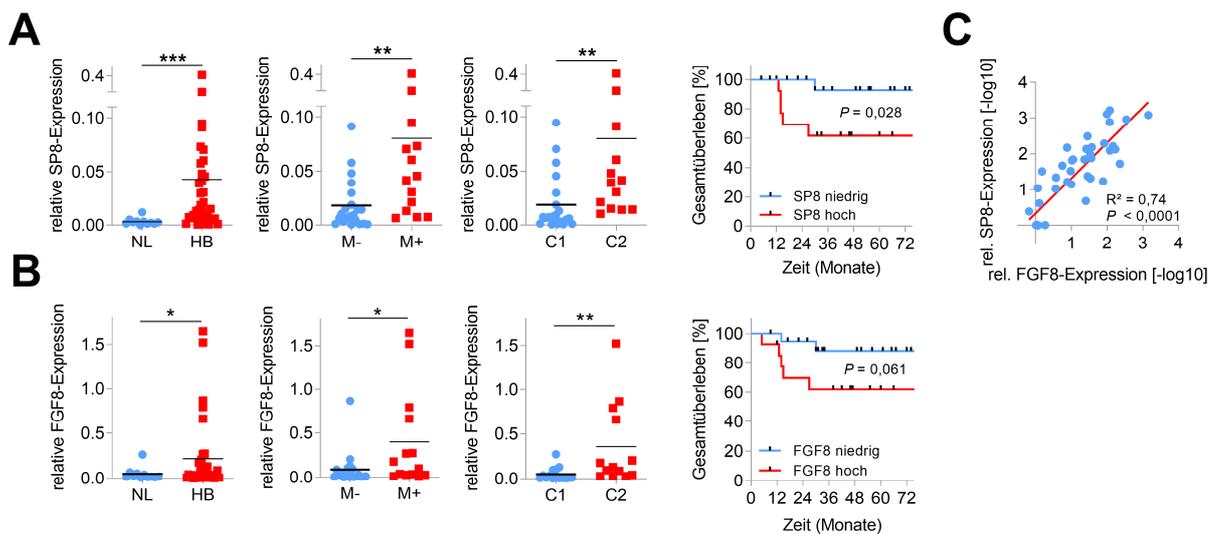


Abbildung 21: (A) *SP8*- und *FGF8*- (B) Expressionswerte wurden mittels RT-Q-PCR bestimmt, gegen das *Housekeeping*-Gen *TBP* normalisiert und entsprechend ihrer Kategorisierung als NL oder HB, M- oder M+ Tumor, und C1- oder C2-Tumor aufgetragen. Die statistische Signifikanz aller Experimente wurde anhand des Mann-Whitney-Tests ermittelt ($P < 0,05$). Das Gesamtüberleben wurde vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum Zeitpunkt des Todes aufgezeichnet und berechnet und ist für 33 HB-Patienten dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde anhand des Mantel-Cox-Tests berechnet. (C) Die Korrelation der *SP8*- und *FGF8*-Expression in 44 Leberproben. Punkte repräsentieren $-\log_{10}$ -Werte der relativen *SP8*-Expression aufgetragen gegen die $-\log_{10}$ -Werte der relativen *FGF8*-Expression.

4.3.3 SP8 fördert die Motilität, Invasion und Selbsterneuerungskapazität von Hep3B-Pool-Zellen

Um den Einfluss von SP8 auf die Zelleigenschaften zu studieren, wurde ein stabil transfizierter Tetracyclin-induzierbarer Pool an SP8-exprimierenden Hep3B-Zellen generiert. Dafür wurde zunächst der episomale pRTR-SP8-VSV-Vektor durch Übertragung von SP8-VSV aus pcDNA3-SP8-VSV (Abb. 22A, oben) erstellt, in Hep3B-Zellen eingebracht, positive Zellen durch Puromycin-Selektion bzw. *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS)-Selektion angereichert (Abb. 22B) und seine Qualität auf RNA- und Protein-Ebene validiert (Abb. 22C). Detaillierte Angaben zur Vorgehensweise sind im Anhang zu finden.

Im Anschluss an die Validierung wurde der Hep3B-Pool auf seine proliferativen, motilen, migratorischen und invasiven Eigenschaften, sowie auf seine Selbsterneuerungskapazität getestet. Hierbei führte die SP8-Überexpression zu keinen erkennbaren Unterschieden in der Proliferation (Abb. 22D), aber zu einer signifikanten Steigerung der Motilität (Abb. 22E) von 70 auf 91%, der Selbsterneuerung um das 1,4-fache (Abb. 22F) und der Invasion um das 3,3-fache (Abb. 22H) im Vergleich zu den nicht-induzierten Kontrollzellen, während die Migration keine signifikante Änderung aufwies (Abb. 22G).

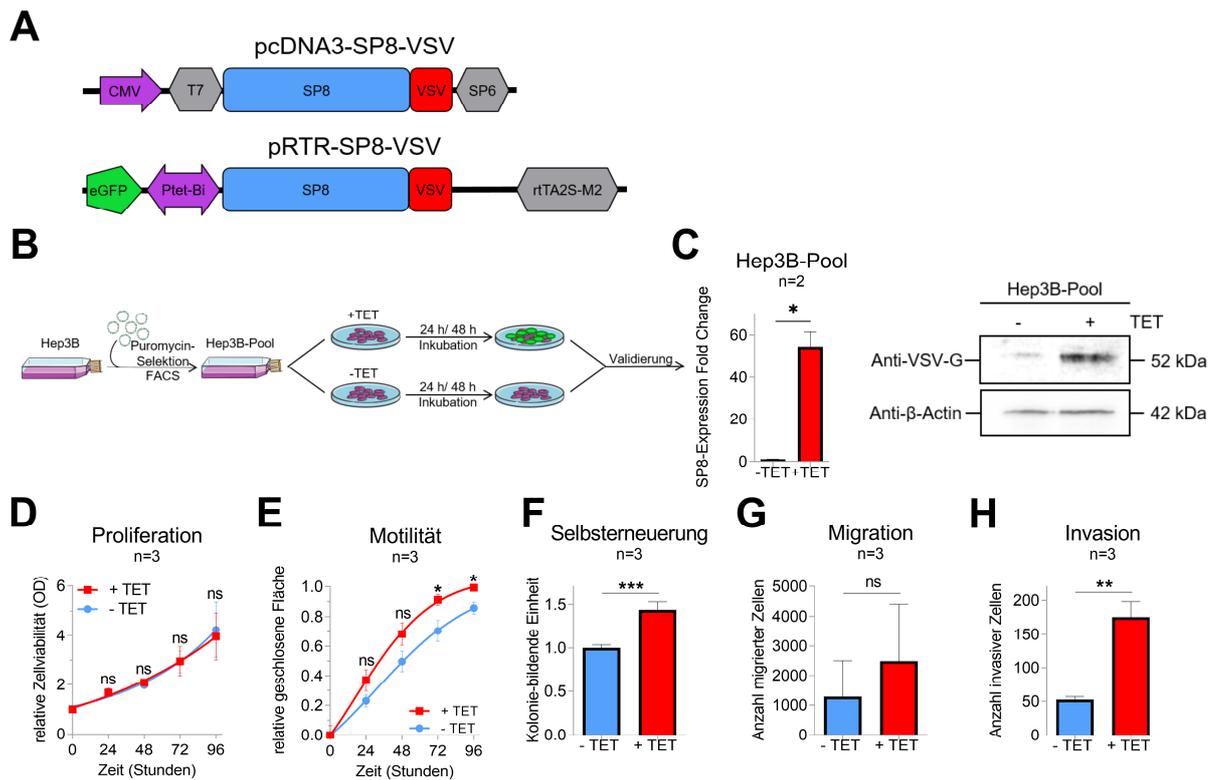


Abbildung 22: (A) Darstellung der Vektoren pcDNA3-SP8-VSV und pRTR-SP8-VSV mit der *SP8* cDNA, dem C-terminalen VSV-tag, den Promotoren CMV, T7, SP6, dem bidirektionellen Tet-induzierbaren Promotor Ptet-Bi, der eGFP-Domäne (eGFP) und einer reversen Transaktivator-Domäne (rtTA2S-M2). (B) Schematische Abbildung der Hep3B-Pool-Generierung, welcher durch stabile Transfektion mit dem Tetracyclin-induzierbaren pRTR-SP8-VSV-Vektor erstellt wurde. Transfizierte Zellen wurden anschließend mit Puromycin selektiert und durch *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS) angereichert. Die erfolgte *SP8*-Induktion konnte durch die Detektion von eGFP am Fluoreszenzmikroskop überprüft und durch RT-Q-PCR und Western Blot auf (C) RNA- und Protein-Ebene analysiert werden. Assays zur Bestimmung der (D) proliferativen, (E) motilen, (G) migratorischen und (H) invasiven Zelleigenschaften, sowie der (F) Selbsterneuerungskapazität wurden im Hep3B-Pool durchgeführt. Der Mittelwert \pm SEM wurde aus der Anzahl der angegebenen Experimente berechnet. Die statistische Signifikanz aller Experimente wurde durch Anwendung des Mann-Whitney-Tests berechnet. ns: nicht-signifikant; **P*-Wert < 0,05, ***P*-Wert < 0,01, ****P*-Wert < 0,001.

4.3.4 Hep3B-Zellen durchlaufen den Prozess der EMT nach Langzeit-SP8-Induktion

Um die molekularen Mechanismen zu ermitteln, die das SP8-vermittelte aggressive Tumorverhalten bedingen, wurden die Hep3B-Pool-Zellen einer Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung unterzogen und SP8-induzierte mit nicht-induzierten Zellen verglichen. Dabei wurden insgesamt 235 differentiell exprimierte Gene mit einem Fold Change > 2 und einem *P*-Wert < 0,05 (Abb. 23A) identifiziert. Zwei der am stärksten hochregulierten Gene waren *secreted protein acidic and rich in cysteine* (*SPARC*) und *secreted phosphoprotein 1* (*SPP1*), bekannte Initiatoren der EMT, indem sie das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin (*CDH1*) inhibieren¹⁴⁶⁻¹⁴⁷. Weiterhin war unter den stark herunterregulierten Genen *mutated in colorectal*

cancer (MCC) zu finden, welches durch Interaktion mit CDH1 einen positiven Effekt auf die Zell-Zelladhäsion ausübt.¹⁴⁸ Übereinstimmend damit zeigte die funktionelle Annotation der detektierten differentiell exprimierten Gene mit *DAVID* eine starke Anreicherung von Genen im Bereich der extrazellulären Matrix (EZM-Organisation, EZM-Rezeptorinteraktion und EZM-Abbau), der Zelladhäsion, der fokalen Adhäsion, sowie der positiven Regulierung der Zellmigration (Abb. 23B) und ließ damit eine generelle Rolle von SP8 im Prozess der EMT vermuten.

Die Hochregulation des mesenchymalen Markers Vimentin (VIM) und die Herunterregulation des Zelladhäsionsmarkers CDH1 stellen die wesentlichen Faktoren, die der EMT zugrunde liegen, dar⁶⁹, weshalb zunächst die Expression von *VIM* und *CDH1* sechs Tage nach der SP8-Induktion analysiert wurde. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg der mRNA-Werte von *VIM* um das 1,45-fache verzeichnet werden, während sich die *CDH1*-Werte um die Hälfte im Vergleich zu den nicht-induzierten Kontrollzellen reduzierten (Abb. 23C). Konsequenterweise ließen sich diese Veränderungen auch auf Protein-Ebene nachweisen, wobei für VIM ein Anstieg des Protein-Levels und für CDH1 ein Abfall der Protein-Werte erkennbar war (Abb. 23C). Durch die nachfolgende Anwendung der Immunfluoreszenz konnte die quantitative Analyse aus dem Western Blot auch qualitativ manifestiert werden. Weiterhin visualisierte diese den Wandel hin zu einem mesenchymalen Zellphänotyp deutlich, wobei die eher kachelförmige Anordnung der Zellen in eine diffuse Anordnung mit spindelartigen Zellen überging und mit einer Änderung der Proteinlokalisierung in die Zellausläufer für VIM bzw. von der Zellmembran ins Zytoplasma für CDH1 einherging (Abb. 23D, weiße Pfeile).

Zusätzlich zu VIM und CDH1 ließ sich auch für andere EMT-Markergene wie *zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1)*, *twist-related protein 1 (TWIST1)*, *secreted phosphoprotein 1 (SPP1)*, *delta-like 1 homolog (DLK1)*, *semaphorin A (SEMA5A)* und *caveolin 2 (CAV2)* durch RT-Q-PCR eine signifikante Modulation der Expression nach SP8-Induktion nachweisen. Zusammenfassend zeigte sich, dass die SP8-Überexpression zur Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps in Hep3B-Zellen führte.

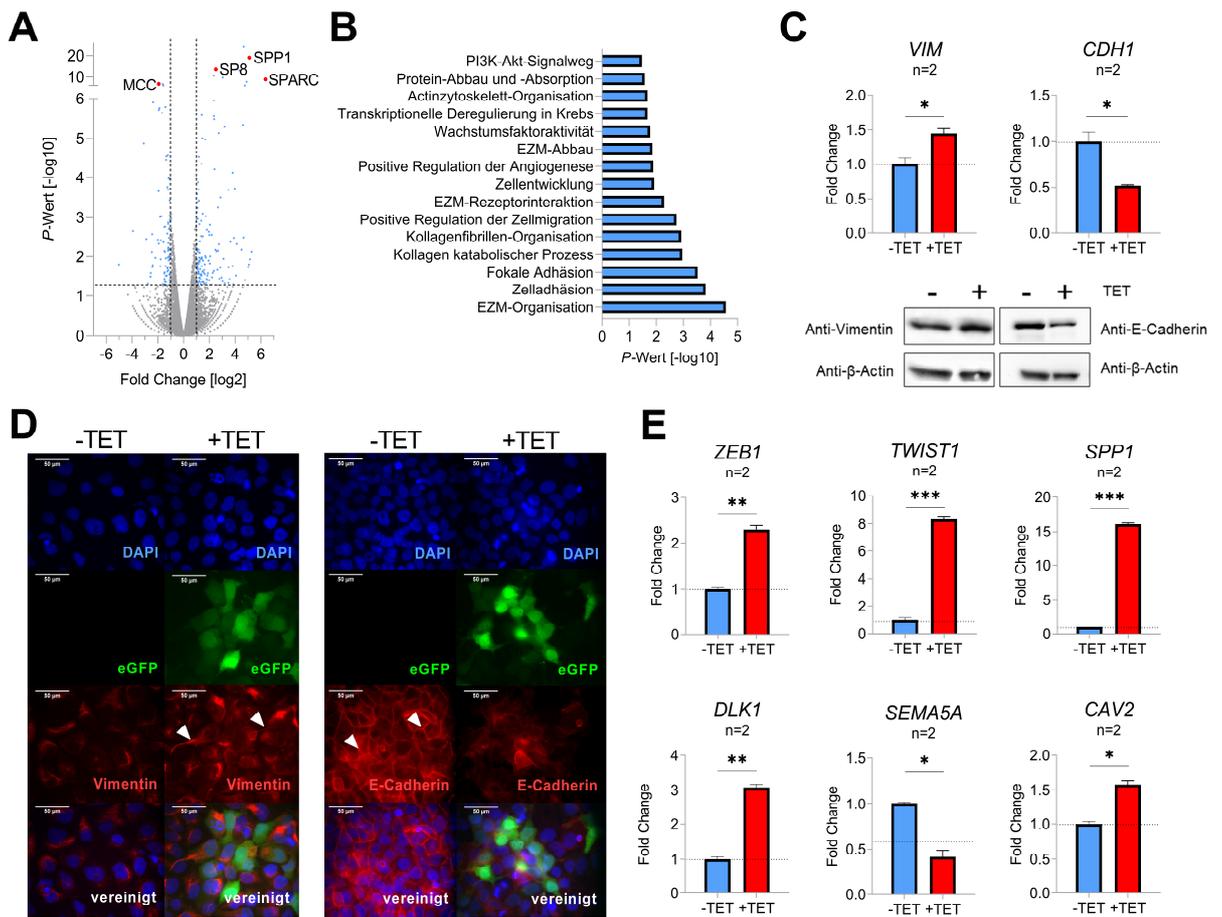


Abbildung 23: SP8 und die epitheliale-mesenchymale Transition. (A) Streudiagramm der differentiell exprimierten Gene zwischen SP8-induzierten und nicht-induzierten Hep3B-Pool-Zellen 144 h nach Induktion. Gene mit einem log₂-Fold Change > 1 und einem P-Wert > 0,05 sind in hellblau dargestellt. SP8, SPP1, SPARC und MCC sind in rot markiert. (B) Funktionelle Annotation der identifizierten, differentiell exprimierten Gene mit DAVID. (C) Detektion der VIM- und CDH1-Expression auf RNA- (C, oben) und Protein-Ebene (C, unten) in Hep3B-Pool-Zellen sechs Tage nach SP8-Induktion mittels RT-Q-PCR und Western Blot. Die Standardisierung der gleichen Proteinmenge erfolgte mit β-Actin. Die Bilder stellen eine repräsentative Auswahl dar. (D) Immunfluoreszenzfärbung von Vimentin (links) und E-Cadherin (rechts) sechs Tage nach SP8-Induktion. Induzierte Pool-Zellen, welche eGFP exprimieren, sind in grün dargestellt. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. (E) Die RNA-Expression von ZEB1, TWIST1, SPP1, DLK1, SEMA5A und CAV2 wurde mittels RT-Q-PCR 144 h nach Induktion analysiert und mit dem Housekeeping-Gen TBP normalisiert. Die Signifikanz wurde durch Anwendung des Student's t-Tests berechnet. ns: nicht-signifikant; *P-Wert < 0,05, **P-Wert < 0,01, ***P-Wert < 0,001.

4.3.5 FGF8 ist ein essentieller Faktor des SP8-vermittelten, aggressiven Tumorphänotyps

Da SP8 ein Transkriptionsfaktor ist, der an DNA bindet, war es naheliegend, dass in einem nächsten Schritt potentielle Zielgene von SP8 untersucht werden sollten, die für den aggressiven Tumorphänotyp essentiell sind.

Interessanterweise wurde FGF8 bereits im Zusammenhang der Leberentwicklung beschrieben und konnte auch mit dem Prozess der EMT in Verbindung gebracht werden¹⁴⁹, weshalb FGF8 als direktes Zielgen im Folgenden näher betrachtet wurde.

4 ERGEBNISSE

Da als Zielgen eines Transkriptionsfaktors unmittelbar die Expression betroffen wäre, wurden zunächst die mRNA-Werte von *FGF8* 48 h nach SP8-Induktion in Hep3B-Pool-Zellen bestimmt. Dabei manifestierte sich ein signifikanter Anstieg der *FGF8*-Expression um das 3-fache im Vergleich zu den nicht-induzierten Kontrollzellen (Abb. 24A).

Um zu untersuchen, ob SP8 direkt für die *FGF8*-Expression in Leberkrebszellen verantwortlich ist, wurde die *FGF8*-Promotorregion auf SP8-Bindestellen, welche durch Sahara et al.¹⁵⁰ im Mausmodell beschrieben wurden, abgesucht. Dabei wurden fünf mögliche Bindestellen 215 bp bis 305 bp *upstream* von Exon 1 identifiziert, welche eine starke spezieübergreifende Konservierung aufwiesen (Abb. 24B), und diese mittels ChIP verifiziert. Die Ergebnisse der ChIP zusammen mit der anschließenden Q-PCR bestätigten die fünf theoretischen Bindestellen auch in der Praxis mit einer signifikanten DNA-Anreicherung der BS2-5 von 2,6 im Vergleich zu den Kontroll-IPs (Abb. 24C, rechts), was auch die deutliche Korrelation der Expression in den Tumorproben erklärt. Auch an BS1 zeichnete sich ein ähnlicher Trend ab, dieser blieb allerdings über dem Signifikanzniveau (Abb. 24C, links).

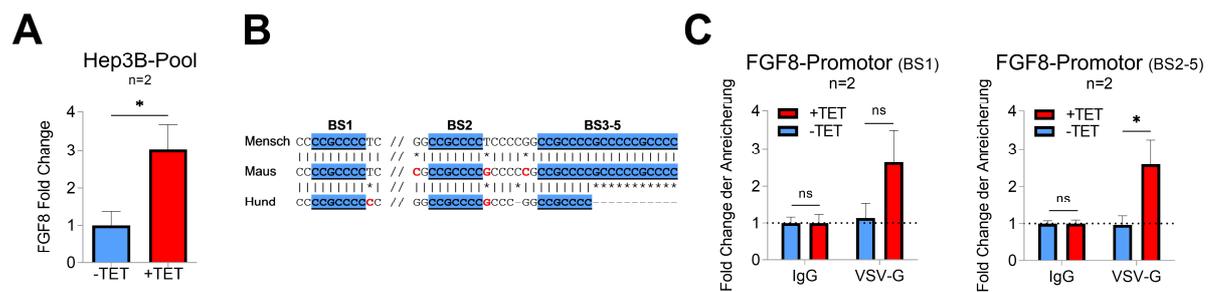


Abbildung 24: (A) Säulendiagramm, das die Änderung der *FGF8*-Expression 48 h nach stabiler SP8-Modulation ausweist. (B) Schematischer Überblick der SP8-Bindestellen BS1, BS2 und BS3-5 am humanen *FGF8*-Lokus auf Chromosom 10q24.32. Die Bindestellen sind in blau hervorgehoben. (C) Säulendiagramme, die die Anreicherung von SP8-gebundenen DNA-Fragmenten an BS1 bzw. BS2-5 48h nach erfolgter SP8-Induktion im Vergleich zu den nicht-induzierten Kontrollzellen bzw. den Kontroll-IPs mit dem unspezifischen IgG-Antikörper darstellen.

Um zu erforschen, ob *FGF8* einen essentiellen Beitrag zur SP8 vermittelten Aggressivität von Hepatomzellen liefert, wurde die Methodik des *CRISPR interference* angewendet, die erst kürzlich von Larson et al. 2013 beschrieben wurde¹⁵¹ und einen langfristigen Knock-down von *FGF8* gewährleistet. Die dafür nötigen Plasmidklonierungsschritte und die Überprüfung der korrekten Expression, sowie der Funktionalität des generierten Plasmids sind detailliert im Anhang beschrieben (siehe Anhang, Abb. 32).

Nach der Validierung und Optimierung von *CRISPR interference* konnte dieser Ansatz nun in den Hep3B-Pool-Zellen genutzt werden. Hier erzielte die Anwendung mit dem pPlat-dCas9-sfGFP-KRAB-gRNA-1 Fusionskonstrukt einen *FGF8*-Knock-down von 56%, während die *SP8*-Expressionslevel weiterhin eine starke Überexpression manifestierten (Abb. 25B, erster und zweiter Graph). Im Vergleich dazu war mit pPlat-dCas9-gRNA-1 Kontrollplasmid erneut eine

gesteigerte Expression von *SP8* und *FGF8* in Hep3B-Pool-Zellen nach TET-Induktion messbar (Abb. 25A, erster und zweiter Graph von links).

Da wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben die *SP8*-Modulation die stärksten Auswirkungen auf die Motilität und die Selbsterneuerungsfähigkeit von Hepatomzellen hatte, sollte der Wound healing Assay und der Klonogene Assay mit einem gleichzeitigen *FGF8*-Knock-down durchgeführt werden. Dabei zeigte sich mit dem pPlat-dCas9-Kontrollvektor erneut eine verstärkte Motilität und eine gesteigerte Selbsterneuerungskapazität nach *SP8*-Induktion (Abb. 25A, dritter und vierter Graph von links). Die *FGF8*-Suppression dagegen sorgte für eine Limitierung der Zellmotilität und schränkte auch die Selbsterneuerungskapazität auf die Werte der Kontrollgruppe ein (Abb. 25B, dritter und vierter Graph von links), sodass *FGF8* als Hauptmediator des *SP8*-vermittelten aggressiven Tumorphänotyps bestätigt werden konnte.

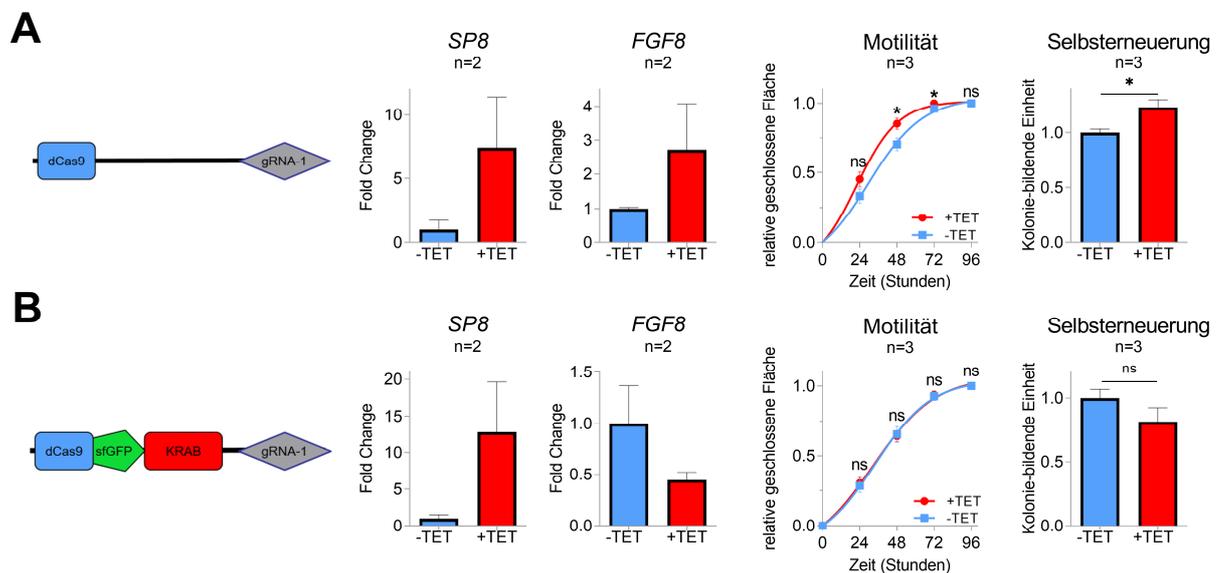


Abbildung 25: (A+B) Expressionsvektoren für dCas9 und dCas9-sfGFP-KRAB, welche für den *CRISPR interference*-vermittelten *FGF8*-Knock-down zusammen mit der gRNA-1 genutzt wurden. Wound healing und Klonogener Assay von TET-induzierten und nicht-induzierten Hep3B-Zellen unter Anwendung vom pPlat-dCas9-gRNA-1-Kontrollplasmid oder dem *FGF8*-Knock-down-vermittelnden pPlat-dCas9-sfGFP-KRAB-gRNA-1-Vektor. Der Mittelwert \pm SEM wurde aus der Anzahl der angegebenen Experimente berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des *Student's t*-Test berechnet ($P < 0,05$).

4.3.6 Der *SP8*-vermittelte aggressive Tumorphänotyp als generelles Phänomen in Lebertumorzellen

Um den generellen Einfluss von *SP8* auf Lebertumorzellen zu untersuchen, wurden zusätzlich transiente *Gain-of-function*- und *Loss-of-function*-Studien in den fünf Hepatomzelllinien HepG2, Hep3B, HUH7, HUH6 und HepT1 durchgeführt. Dafür wurde zunächst die endogene *SP8*-Expression der Zelllinien bestimmt, wobei die beiden HB-Zelllinien eine hohe (HepT1 und HUH6) und die drei HCC-Zelllinien eine niedrige endogene *SP8*-Expression zeigten (siehe Anhang Abb. 31C).

4 ERGEBNISSE

Für die Durchführung der *Gain-of-function*-Experimente wurde der in Abschnitt 4.3.3 (Abb. 22A) beschriebene pcDNA3-SP8-VSV-Vektor in die drei niedrig exprimierenden Zelllinien HepG2, Hep3B und HUH7 eingebracht. *Loss-of-function*-Studien erfolgten durch siRNA-vermittelten Knock-down von SP8 (siSP8) in den hochexprimierenden Zelllinien HUH6 und HepT1, sowie auch in HUH7-Zellen. Eine erfolgreiche Modulation der SP8-Level durch das Einbringen der VSV-getaggen SP8 cDNA oder von siSP8 konnte auf RNA- (Abb. 26A+B) und Protein-Ebene (Abb. 26C+D) nachgewiesen werden und resultierte in einer signifikanten SP8-Überexpression (Abb. 26A+C) beziehungsweise einer robusten SP8-Reduktion von bis zu 70% (Abb. 26B+D).

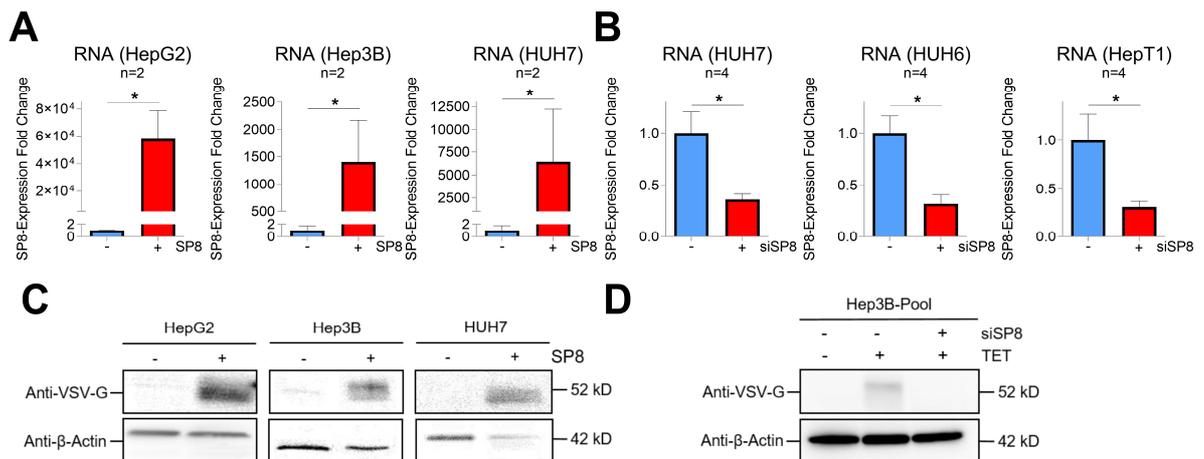


Abbildung 26: SP8-Expression in Hepatomzelllinien 24 h (A+B) beziehungsweise 48 h (C+D) nach der Transfektion mit einerseits (A+C) dem leerem Kontrollvektor (-SP8, pcDNA3-VSV) oder dem SP8-Expressionsplasmid (+SP8, pcDNA3-SP8-VSV) oder andererseits (B) mit der Kontroll-siRNA (siNTC) oder der gegen SP8-mRNA-gerichteten siRNA (siSP8). (A+B) Die Analyse wurde mittels RT-Q-PCR durchgeführt und mit dem *Housekeeping*-Gen *TBP* normalisiert. Die statistische Signifikanz wurde durch den Mann-Whitney-Test ermittelt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$). (C) Detektion der SP8-Protein-Werte in HepG2, Hep3B und HUH7 oder (D) Hep3B-Pool-Zellen 48 h nach SP8-Induktion mittels Western Blot. β -Actin wurde zur Standardisierung äquivalenter Proteinmenge genutzt.

Zur Analyse der Proliferation, Motilität, Selbsterneuerung sowie der migratorischen und invasiven Eigenschaften wurden erneut der MTT-Assay, der Wound healing Assay, der klonogene Assay, sowie der Boyden Chamber Assay herangezogen.

Entsprechend der Ergebnisse aus der stabilen Transfektion (siehe Abschnitt 4.3.3, Abb. 22) führte die SP8-Modulation zu keiner Änderung der Proliferation in allen 5 Zelllinien (Abb. 27A+B), jedoch zeigte sich durch die SP8-Überexpression ein signifikant positiver Effekt auf das Motilitätsverhalten von HepG2- und HUH7-Zellen (Abb. 27C), während der Effekt durch den SP8-Knock-down in HUH7 umgedreht werden konnte (Abb. 27D, links). Dieser Trend zeichnete sich ebenso in HUH6-Zellen ab (Abb. 27D, mitte), blieb allerdings über dem Signifikanzniveau. Kein Effekt war in Hep3B (Abb. 27C, mitte) und HepT1 (Abb. 27D, rechts) erkennbar. Die Untersuchung der Selbsterneuerungskapazität ergab einen signifikanten Anstieg der Kolonienzahl um das 1,8-, 1,3- und 1,4-fache in HepG2-, Hep3B- und HUH7-Zellen nach

4 ERGEBNISSE

erfolgter SP8-Überexpression (Abb. 27E). Durch den *SP8*-Knock-down ließ sich dieser Effekt umkehren, wobei sich die Kolonienzahl von HUH7 und HUH6 nur noch auf etwa 60% der Anzahl der Kontrollzellen belief (Abb. 27F). Erneut zeigte sich in den HepT1-Zellen keine Auswirkung. Aus den Ergebnissen des Boyden Chamber Assays ließ sich ein positiver Effekt einer SP8-Überexpression auf die Zellmigration und -invasion ableiten, welcher sich in HUH7- (Abb. 27G, rechts) und HepG2-Zellen (Abb. 27I, links) als signifikant erwies. Der Einfluss des *SP8*-Knock-downs war im Allgemeinen sehr gering und blieb in allen Fällen über dem Signifikanzniveau, was auf ein bereits geringes Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen zurückzuführen war. Dennoch konnte festgehalten werden, dass ein Trend zu reduzierter Migration bzw. zu weniger invasiven Zellen bestand (Abb. 27H+J).

4 ERGEBNISSE

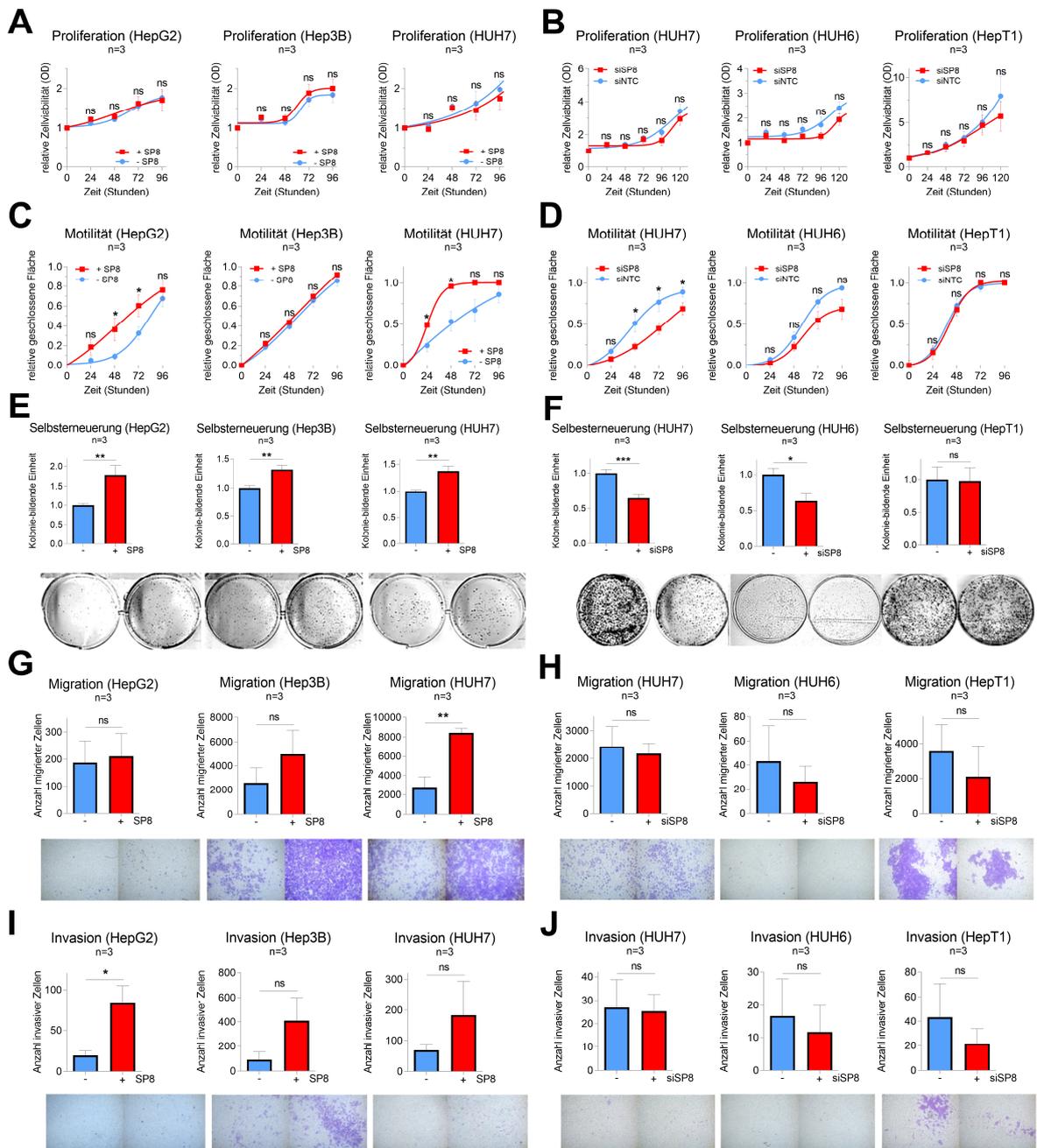


Abbildung 27: Gain- und Loss-of-function-Experimente in Hepatomzelllinien nach Transfektion mit einerseits (A, C, E, G, I) dem leeren Kontrollplasmid pcDNA3-VSV (-SP8) oder dem SP8-Expressionsplasmid pcDNA3-SP8-VSV (+SP8), oder andererseits nach Elektroporation (B, D, F, H, J) mit einer ungerichteten Kontroll-siRNA (siNTC) oder einer SP8-gerichteten siRNA (siSP8). (A, B) Die Zellproliferation wurde an den angegebenen Zeitpunkten durch Anwendung des MTT-Assays bestimmt. (C, D) Die Zellmotilität wurde mittels Wound healing Assays zu den angegebenen Zeitpunkten aufgezeichnet. (E, F) Die Selbsterneuerung wurde durch Koloniezählung 10 Tage nach Transfektion ermittelt. Repräsentative Bilder des Assays sind unter dem jeweiligen Graphen angegeben. (G, H) Die Migrationsfähigkeit ergab sich aus der Anzahl migrierter Zellen durch die Poren der eingesetzten Boyden-Kammern 48 h nach der Transfektion. (I, J) Die Invasionsfähigkeit ergab sich aus der Anzahl invasiver Zellen durch die Matrigel-beschichteten Poren der eingesetzten Boyden-Kammern 72 h nach der Transfektion. Der Mittelwert \pm SEM wurde aus der Anzahl der angegebenen unabhängigen Experimente berechnet. Die statistische Signifikanz wurde durch den Mann-Whitney-Test ermittelt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$).

4.3.7 Inhibition der SP-Transkriptionsfaktorfamilie als potentielle neue Behandlungsstrategie von aggressiven HBs

Mithramycin A (MMA) ist ein von der *Food and Drug Administration* zugelassenes Krebsmedikament, das die Bindung an GC-reiche Genpromotoren blockiert und damit als effektiver Inhibitor der SP-Transkriptionsfaktorfamilie wirkt.¹⁵²

Um seine SP-spezifische Wirksamkeit zu testen, wurde zunächst untersucht, ob MMA in der Lage ist, die SP8-vermittelten Effekte in Hep3B-Pool-Zellen aufzuheben. Tatsächlich führte die Anwendung von lediglich 10 nM MMA zu einer fast vollständigen Neutralisierung der durch SP8-Induktion gesteigerten Selbsterneuerungskapazität in Hep3B-Pool-Zellen im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Zellen (Abb. 28A). In der Folge wurden verschiedene Konzentrationen im Bereich von 1-100 nM des Inhibitors in den SP8-hochexprimierenden Zelllinien HUH7, HUH6 und HepT1 getestet.

Dabei zeigte sich, dass bereits sehr niedrige Konzentrationen von 10 nM für HUH7 und HUH6 sowie von 30 nM für HepT1 ausreichend waren, um die Selbsterneuerungsfähigkeit der Zellen signifikant zu reduzieren (Abb. 28B), was MMA als potentielle neue Behandlungsstrategie für Hochrisiko-Patienten des HBs interessant macht.

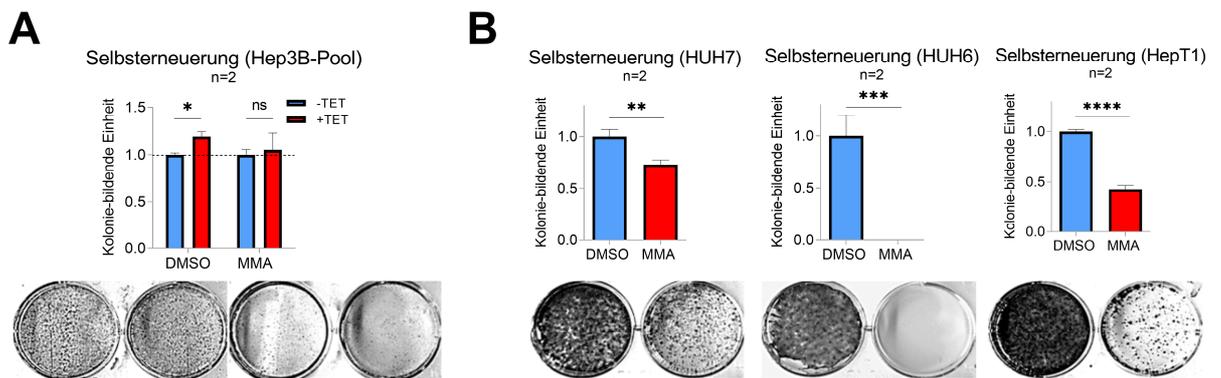


Abbildung 28: (A) Hep3B-Pool-Zellen wurden mit 10 nM Mithramycin A (MMA) oder DMSO als Kontrolle mit oder ohne SP8-Induktion behandelt. (B) HUH7-, HUH6- und HepT1-Zellen wurden mit 10 nM (HUH7 und HUH6) oder 30 nM (HepT1) MMA oder DMSO als Kontrolle behandelt. Repräsentative Abbildungen des Zellassays sind unter den Graphen abgebildet. Die Anzahl der Kolonien wurde 10 Tage nach Behandlung erfasst und die Ergebnisse auf 1 normalisiert. Der Mittelwert \pm SEM wurde aus der Anzahl der angegebenen unabhängigen Experimente berechnet. Die statistische Signifikanz wurde durch den *Student's t-Test* ermittelt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$).

5 DISKUSSION

Standardrisikopatienten des HBs weisen eine exzellente Überlebenswahrscheinlichkeit von 90% auf,⁶⁰ während Hochrisikopatienten immer noch mit einer äußerst schlechten Prognose von 50% konfrontiert sind¹⁵³. Die Identifizierung der molekularen Mechanismen, die das Hochrisikoprofil bedingen und die Analyse neuer Biomarker, die eine klare Diskriminierung erlauben, stellten daher große Forschungsbemühungen der letzten Jahre dar.^{30, 32, 47, 50, 52} Auch unsere Methylom- und Transkriptomstudie von 28 beziehungsweise 11 HBs widmete sich dieser Aufgabe und setzte sich zum Ziel, charakteristische genetische und epigenetische Veränderungen aufzudecken. Das HB präsentierte sich dabei biologisch als ein sehr diverses Krankheitsspektrum, welches von keinen detektierbaren Aberrationen bis hin zu hoher genomischer Instabilität und onkogener Signalwegsaktivierung reichte.

5.1 Multiomics-Ansatz definiert zwei molekulare Subgruppen des HBs

Veränderte DNA-Methylierung insbesondere an CpG-Inseln nimmt Einfluss auf die Transkription und stellt durch die mögliche Repression von Tumorsuppressorgenen und die potentielle Aktivierung von Onkogenen ein frühes Event der Karzinogenese dar. Um den Einfluss der DNA-Methylierung auf die Entwicklung des HBs zu studieren, wurde in dieser Arbeit das Methylom von 28 HBs umfassend analysiert und zunächst im Kontext von Normalleber-Proben und 12 weiteren kindlichen Lebertumoren wie pädiatrischen hepatozellulären Karzinomen (HCC), fibrolamellären HCC (fIHCC) und malignen Rhabdoidtumoren (MRT) betrachtet.

Dabei deckten wir zwei divergente Methylierungsprofile der Lebertumoren (G1 und G2) auf, die sich erstaunlicherweise nicht nur auf HBs beschränkten, sondern auch auf die weiteren Lebertumorentitäten HCC, fIHCC und MRT erstreckten, und sich durch Komplementierung öffentlich zugänglicher Methylom-Daten des HBs als äußerst robust erwiesen. Eine allgemeine Hypomethylierung in den Tumoren unterschied sich in den beiden Subgruppen nochmals sehr deutlich und konnte für G2-Tumoren als Charakteristikum zusammen mit einer starken Hypermethylierung der CpG-Inseln und damit auch der Promotorregionen festgehalten werden. Bereits andere Studien konnten eine Hypomethylierung im HB und die Präsenz zweier epigenetischer Subgruppen manifestieren^{47, 134} und bekräftigten damit unsere Ergebnisse.

Die weiterführende Bestimmung chromosomaler Veränderungen anhand der 450k-Daten bestätigte gemeinhin bekannte Muster aus früheren Studien wie Zugewinne in 1q, 2q, sowie Verluste in 1p und 4q,^{26, 30, 32, 47} legte jedoch auch neue Zusammenhänge zwischen chromosomalen Defekten und epigenetischen Subgruppen kindlicher Lebertumoren offen. So waren G1-Tumoren nur von wenigen genomischen Veränderungen in 6 von 21 Tumoren begleitet, während in G2-Tumoren alle Tumoren mehr oder weniger starke chromosomale

Defekte aufwiesen, wobei der Gewinn der Chromosomenregion 1q41 und der Verlust von Chromosomenabschnitt 4q33-4q35.1 signifikante Unterschiede zwischen G1 und G2 zeigte.

In diesem Kontext scheint es daher besonders interessant, dass nahezu ein Drittel der G2-Tumoren einen Verlust des *FAT1*-Lokus (Chromosom 4q35) zu verzeichnen hatte, welches ein Cadherin-ähnliches Protein codiert und das Krebswachstum durch die Inhibition der Nukleuslokalisation von β -Catenin unterdrückt und damit die Wnt-Signalwegsaktivierung moduliert.¹⁵⁴ Diese Aussage unterstützend wiesen G2-Tumoren durch das Auftreten von Mutationen in *CTNNB1* bzw. *APC* Wnt-Signalwegs-aktivierende Mutationen in allen Proben auf, während in nahezu 40% der G1-Tumore keine Wnt-Signalwegsmutation detektierbar war. Die Assoziation der Subgruppen mit weiteren klinischen Parametern konnte zudem relevante Unterschiede im Gesamtüberleben, in der Metastasierung und multifokalem Wachstum offenlegen, wobei für G2-HBs diese jeweils sehr ungünstig ausfielen.

Insgesamt ließ die Untersuchung des Methylierungsprofils die Schlüsse zu, dass sich HBs in zwei epigenetische Cluster einteilen lassen, die sich durch den Grad der Hypomethylierung und genomischen Instabilität, durch die Anzahl genetischer Aberrationen des Wnt-Signalwegs, sowie durch die Assoziation mit klinischen Parametern differenzieren, und dass sich dies auf weitere pädiatrische Lebertumorentitäten ausweiten lässt.

Die simultane Analyse von globalen Expressions-Daten im HB manifestierte starke Kongruenz aber auch ein Zusammenspiel von Epigenom und Transkriptom in der Bestimmung molekular divergenter Tumorentitäten. So konnten einerseits die epigenetischen Cluster mit der 16-Gen-Signatur assoziiert werden, wobei 88,9% (8 aus 9) der C2-HBs entsprechend Cairo et al.³⁰ in der G2-Gruppe zu finden waren. Andererseits legte auch das Transkriptionsprofil eine Zweiteilung des Datensatzes offen, welches durch die Extraktion der 16- bzw. 4-Gen-Signatur ebenso mit den molekularen Subklassen C1/C2/C2A^{30, 50} in Verbindung gebracht werden konnte. Zudem ließ sich durch Expressionanalyse von *Downstream*-Targets des Wnt-Signalweges eine deutlich stärkere Aktivierung in G2- im Vergleich zu G1-Tumoren beziehungsweise in NL-Proben ausmachen, und spiegelt somit auch auf Transkriptionsebene die beobachteten genetischen Defekte im Wnt-Signalweg wider. Das Transkriptionsprofil deutete weiterhin auf eine starke Aktivierung von Zellzyklus- und DNA-Reparatur-Genen in G2-HBs hin. Ersteres war durch die Assoziation mit der 16-Gen-Signatur und den darin bereits enthaltenen Zellzyklusgenen nicht überraschend und weist auf einen proliferativen Tumorphänotyp von G2-HBs hin, wie er bereits für C2-Tumore beschrieben ist³⁰. Ebenso leistete insbesondere die Überexpression von darunter befindlichen Regulatoren des mitotischen Zellzykluses und des Spindelkontrollpunktes wie BUB1, BUB1B, AURKA und AURKB, die zu

Zentrosomen-Amplifikationen und Defekten in der Chromosomensegregation führen, einen Beitrag zu genomischer Instabilität und Aneuploidie.¹⁵⁵

Dass sich in G2-HBs mit einem hohen Grad genomischer Instabilität auch eine Überexpression von DNA-Reparatur-Genen manifestierte, war zunächst nicht intuitiv und ließ Raum für Spekulationen. Einerseits könnte sie die Folge genetischer Strangbrüche darstellen, die durch Änderung der 3D-Chromatin-Struktur ihre Aktivierung in Gang setzte.¹⁵⁶ Andererseits wäre auch durch die Kombination einer gesteigerten Proliferationsrate und inadäquater Expression der Reparatur-Gene chromosomale Instabilität als Konsequenz vorstellbar.¹⁵⁷

Ein weiterer Unterschied der HB-Subgruppen G1 und G2 betraf den Grad der hepatischen Differenzierung. Während G1-HBs durch eine gesteigerte Expression von Differenzierungsgenen geprägt waren, ließen sich in G2-HBs leberspezifische aber auch allgemeine Stammzellmarker wie *AFP*, *GPC3*, *SALL4*, *DLK1*, *SOX2*, *LGR5* und *EPCAM* verstärkt nachweisen. Im Einklang dessen waren differentiell methylierte Regionen zwischen G1 und G2 gehäuft in näherer Umgebung zu differenzierungs- und stammzellerhaltenden Genen lokalisiert, was auf regulatorische Einflüsse der Methylierung auf die Expression dieser Gene hindeuten könnte. Da die Methylierung von Krebszellen zu großen Teilen die Methylierung der Ursprungszelle widerspiegelt,¹⁵⁸ wäre jedoch ebenso ein unterschiedlicher Differenzierungsgrad der initialen Tumorzelle denkbar. Dem entgegen steht aber, dass histologisch keine signifikanten Unterschiede zwischen G1- und G2-HBs auszumachen waren.

Ferner beobachteten wir einen deutlichen Einfluss der CpG-Insel-Methylierung auf die Expression von Tumorsuppressorgenen in G2-Tumoren, die folglich eine signifikante Reprimierung aufwiesen. Neben dem bekannten Tumorsuppressorgen *RASSF1*^{138, 159}, dessen Methylierung mit Metastasierung und einer schlechten Prognose im HB korreliert¹³⁷ und auch in vielen anderen Krebsarten inaktiviert ist,¹⁶⁰ konnten mit *TSPYL5*, *TUSC1*, *MARVELD1*, *GATA6*, *NKAPL*, *SPINT2* mehrere neue, potentielle Tumorsuppressorgene für das HB identifiziert werden, die für weiterführende funktionelle Analysen infrage kommen. Erstaunlicherweise waren alle Kandidaten bereits als Tumorsuppressorgene in anderen Krebsentitäten, aber auch im adulten HCC beschrieben und ihre epigenetische Inaktivierung ließ sich mit einem aggressiveren Tumorphänotyp in Verbindung bringen.¹⁶¹⁻¹⁶⁸ Im Kontext der zuvor beschriebenen Assoziation mit dem Grad der Differenzierung scheint es besonders interessant, dass die epigenetische Stilllegung von *TSPYL5* in humanen pluripotenten Stammzellen zur Herunterregulation von Differenzierungsgenen und Tumorsuppressorgenen, sowie zur Überexpression von Pluripotenz- und wachstumsfördernden Genen führt.¹⁶⁹ Die epigenetische Inaktivierung von *TSPYL5* wurde ebenso erst kürzlich von Carrillo-Reixach et al.⁴⁷ im HB beobachtet und bekräftigte damit unsere Befunde.

Zusammenfassend zeigte sich ein deutliches Zusammenspiel zwischen Epigenom und Transkriptom des HBs, welches sich in gemeinsamen Assoziationen mit der 16- bzw. 4-Gen-Signatur, der Wnt-Signalwegsaktivierung und Differenzierung äußerte, und besonders durch die starke Korrelation von CpG-Insel-Methylierung und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und damit durch eine reziproke Beeinflussung bestätigt werden konnte.

5.2 Die Aktivierung von TRIM71 in epigenetischer HB-Subgruppe und seine Assoziationen mit dem Wnt-Signalweg

Da unsere Ergebnisse für das HB ein starkes Zusammenspiel des Epigenoms und Transkriptoms für die Entstehung molekularer Cluster zeigten, wurde durch die Überlagerung beider Datensätze mit *TRIM71* ein Marker gefunden, der durch eine starke Hypomethylierung mit gleichzeitiger Überexpression in G2-HBs eine deutliche Gruppeneinteilung zuließ.

TRIM71 wird der TRIM-NHL-Familie zugeordnet, die alle eine RING-, ein bis zwei B-Box-Zinkfinger-, eine CC- und eine NHL-Domäne aufweisen.¹⁷⁰ Entscheidende funktionelle Eigenschaften von *TRIM71* sind die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, die mittels der RING-Domäne erfolgt und die Vermittlung posttranskriptioneller Repression mit oder ohne Bindung von microRNAs.¹⁷⁰⁻¹⁷² Interessanterweise wurde *TRIM71* bereits als Faktor in der Entwicklung von Krebs beschrieben und darunter auch als neues Onkogen im adulten HCC postuliert, in welchem es einen ungünstigen Krankheitsverlauf bedingt.¹⁷³⁻¹⁷⁴ Die Überexpression von *TRIM71* in G2-HBs scheint durch die Ergebnisse dieser aktuellen HCC-Studie und durch die starke negative Korrelation zwischen Methylierung und Expression nicht überraschend. Die darin beobachtete direkte Bindung des Transkriptionsfaktors MYC an den *TRIM71*-Promotor,¹⁷³ welcher ein Schlüssel-Target des Wnt-Signalweges darstellt, beschreibt eine erste potentielle Brücke zwischen der beobachteten Wnt-Signalwegsaktivierung und der *TRIM71*-Überexpression in G2-Tumoren. Dies unterstützend stellten auch andere eine Verbindung von *TRIM71* und MYC im Kontext von embryonalen Stammzellen her,¹⁷² was zur Spekulation einer möglichen Rolle von *TRIM71* in der Tumorprogression als Stammzell- und Zellzyklusregulator anleitete.

Tatsächlich zeigten die Ergebnisse unserer *in vitro*-Experimente in 2 HB- und 2 HCC-Zelllinien, dass *TRIM71* die Proliferations- und Selbsterneuerungseigenschaften positiv stimuliert. Obwohl diese Effekte in allen vier Zelllinien (bis auf Proliferation in Hep3B-Zellen) nachweisbar waren, konnte jedoch nur in HUH6-Zellen eine eindeutige Beeinträchtigung der Wnt-Signalwegsaktivierung durch *TRIM71*-Knock-down auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden. Als E3-Ubiquitin-Ligase und RNA-Bindeprotein ist der Wnt-Signalweg wohl nur einer von vielen unzähligen Mechanismen, auf die *TRIM71* Einfluss nehmen kann. So wurde beispielsweise eine Interaktion von *TRIM71*, AGO2, miR-302, und miR-290 publiziert, die durch Repression der Translation des Zellzyklusinhibitors *CDKN1A* zu einer schnelleren G1-S-Transition und damit

5 DISKUSSION

gesteigerten Zellproliferationsrate in embryonalen Stammzellen beitrug.¹⁷⁵ Auch die Selbsterneuerungsfähigkeit wird durch eine verkürzte G1-Phase unterstützt.¹⁷⁶ Zudem ist TRIM71 in die posttranskriptionelle Regulation von *EGR1*, einem Transkriptionsfaktor der die Zelldifferenzierung fördert und die Zellreprogrammierung behindert, eingebunden.¹⁷⁷ Interessanterweise war sowohl für die Expression von *CDKN1A*, als auch *EGR1* eine äußerst signifikante Herunterregulation in G2-Tumoren verglichen zu G1-Tumoren präsent.

Durch Anwendung der *weighted correlation network*-Analyse konnte weiterhin eine starke Koexpression zwischen *TRIM71*, *LIN28B*, *HMGA2* und *IGF2BP1/3* aufgedeckt werden, welche durch weiterführende Expressionsanalysen in einer größeren Patientenkohorte bestätigt wurde. Bemerkenswerterweise lassen sich alle Kandidaten durch eine gegenseitige Regulation beziehungsweise Suppression mit dem Tumorsuppressor let7, als let7-Targets zusammenfassen,¹⁷⁸⁻¹⁸² deren diverse Rollen als Onkogene in Krebszellen gut bestimmt sind. So können *LIN28B*, *HMGA2* und *IGF2BP1/3* jeweils die Krebszellproliferation und das Tumorstadium anregen, einen aggressiveren Tumorphänotyp induzieren, zur Metastasierung beitragen und die Zelldifferenzierung blockieren.^{53, 183-186} Auch eine reziproke Beeinflussung von *LIN28B*, *HMGA2* und *IGF2BP1/3* ist als sich selbstverstärkendes, onkogenes Dreieck in der Literatur beschrieben.¹⁴¹ Dabei geht man davon aus, dass *LIN28B* die let7-Biogenese verhindert und *IGF2BP1/3* die Expression von *LIN28B* und *HMGA2* verstärkt.¹⁴¹ Da auch für *TRIM71* eine Rolle in der Unterdrückung von let7 bekannt ist,¹⁸⁷ fügt es sich als weiterer Punkt in das Netzwerk ein. Die Interaktion von *TRIM71* und *LIN28B* ist mit einer positiven¹⁷³ bzw. negativen¹⁸⁷ Rückkopplung jedoch diverser beschrieben und ist wohl je nach Kontext neu zu bewerten. Im Zusammenhang mit Leberkrebs wurde *TRIM71* allerdings als verstärkender Faktor der *LIN28B*- und *HMGA2*-Protein-Werte beschrieben, welcher in einer positiven Feedback-Schleife die let7-Funktionen inhibiert.¹⁷³

Zwei genomweite Expressionsanalysen im HB der letzten Jahre zeigten unabhängig voneinander einerseits, dass die Überexpression von *LIN28B* und *HMGA2* mit schlechter Prognose korreliert,³² andererseits die Überexpression von *TRIM71* und *HMGA2* mit der aggressiven C2A-Gruppe einhergeht⁵⁰. Da unsere G2-Gruppe große Äquivalenz zur C2A-Gruppe von Hooks et al. aufweist⁵⁰, und wir beide Einzelbeobachtungen in unserer Studie bestätigen konnten, sowie eine starke Herunterregulation von let7-Familienmitgliedern in G2-Tumoren im Vergleich zu G1 feststellten, wäre die Postulierung einer allgemeinen Verwicklung des *TRIM71*-*HMGA2*-*LIN28B*-*IGF2BP1/3*-Netzwerkes in die Progression von HBs hin zu einem aggressiven, wenig differenzierten Tumorphänotyp wohl nicht zu weit gegriffen.

Insgesamt implizieren unsere Daten durch die Vermittlung von proliferativen und selbsterneuernden Eigenschaften eine onkogene Rolle von *TRIM71* in G2-HBs, die teilweise auf eine Modulation des Wnt-Signalweges zurückzuführen sein könnte, andererseits auch durch

die Verbindung mit dem onkogenen Dreieck HMGA2-LIN28B-IGF2BP1/3 erklärbar wäre und in weiteren Studien genauer untersucht werden sollte.

5.3 Die Aktivierung der SP8-FGF8-Achse in metastasierten HBs

Die chirurgische Resektion stellt die Hauptbehandlungsoption für HB-Patienten dar, während das Auftreten von Metastasen die größte Gefahr für langfristige Heilung birgt.⁶⁰ Ein breiteres Verständnis der molekularen Mechanismen, die die Metastasierung bedingen, würde beim klinischen Management von Patienten mit Metastasen helfen und zu einer früheren Detektion von Metastasen beitragen. Trotz der zahlreichen Studien zur klinischen Heterogenität gibt es kaum Daten zu wichtigen Faktoren des metastasierten HBs, weshalb wir unsere beiden Omics-Datensätze nutzten, um genau diese Lücke zu schließen.

Durch den Vergleich des Transkriptionsprofils von metastasierten und nicht-metastasierten HBs konnten wir den Transkriptionsfaktor *SP8* und den Wachstumsfaktor *FGF8* als die am stärksten hochregulierten Faktoren in metastasierten HBs identifizieren. Durch Integration der Methylierungsdaten stellten wir zudem fest, dass dies mit einer Hypomethylierung von CpGs in der Nähe der jeweiligen Promotorregion der beiden Gene einherging. Besonders bedeutend war es, dass sich hohe Expressionswerte von *SP8* und *FGF8* mit dem aggressiven C2-Subtyp der 16-Gen-Signatur³⁰ und einer schlechten Überlebensprognose assoziieren ließen. Daher war es nicht überraschend, dass *SP8* und *FGF8* ebenso eine starke Überexpression um das 29-beziehungswise 18-fache in G2-HBs manifestierten. Die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente bestätigten diese Beobachtungen und zeigten weiterhin, dass sie mit der Vermittlung aggressiver Tumorcharakteristika wie Zellmotilität, Selbsterneuerung, Migration und Invasion im Zusammenhang stehen. Konsequenterweise konnten diese Effekte durch die Herunterregulation von *FGF8*, welchen wir als direktes transkriptionelles Target von *SP8* ausmachten, neutralisiert werden. Die direkte Kontrolle von *FGF8* durch *SP8* wurde bereits in unterschiedlichen Zellkontexten beschrieben^{150, 188} und konnte von uns nun auch erstmalig für Lebertumorzellen identifiziert werden.

SP8 gehört der engverwandten SP-Zinkfinger-Transkriptionsfaktorfamilie an, die nicht nur kritische Aufgaben während der embryonalen und postnatalen Entwicklung übernehmen, sondern auch häufig in Krebszellen hochreguliert sind.¹⁸⁹ Obwohl die hohe Expressionsrate von SP-Transkriptionsfaktoren dabei generell mit fortgeschrittenem Tumorstadium, invasivem Potential, Metastasierung und schlechter Prognose in Verbindung gebracht wurde,¹⁸⁹⁻¹⁹⁰ ist *SP8* bisher nicht in der Entwicklung von Krebs beschrieben. Jedoch konnte eine erste Studie seine migrationsfördernden Eigenschaften auf corticale Neuronen nachweisen,¹⁹¹ was eine Verwicklung *SP8*-induzierter Effekte in der Progression von Krebs suggeriert. Und tatsächlich konnten wir mit der transkriptionellen Induktion der *FGF8*-Expression einen potentiellen,

onkogenen Mechanismus aufdecken. Die Überexpression von *FGF8* wurde bereits in vielen Tumorentitäten wie Brust-,¹⁹² Kolon-,¹⁹³ Prostatakrebs¹⁹⁴ beschrieben und scheint interessanterweise auch in die Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms¹⁹⁵ verwickelt zu sein. Auch klinisch konnte ein Zusammenhang zwischen FGF8 und fortgeschrittenem Tumorstadium, Lymphknotenmetastasen und schlechterem Gesamtüberleben in Prostata- und Kolonkrebs hergestellt werden.^{193, 196} Diese FGF8-vermittelten negativen Tumorcharakteristika sind wohl auf die Anregung migratorischer und invasiver Fähigkeiten in Krebszellen zurückzuführen, wie sie bereits *in vitro* und *in vivo* in Brust- und Kolonkrebs nachgewiesen werden konnten.^{193, 197} Folgerichtig konnte durch neutralisierende Antikörper gegen FGF8 in präklinischen Tests das Wachstum von Prostatakrebszellen *in vitro*¹⁹⁶ und von Brusttumoren *in vivo*¹⁹⁸ inhibiert werden.

Erstaunlicherweise konnte auch in Knochenmetastasen von Prostatakrebspatienten *FGF8* detektiert werden, während seine ektopische Expression das Wachstum von Prostatakrebszellen als intratibiale Tumoren nochmals steigerte.¹⁹⁴

Insgesamt unterstreichen unsere Ergebnisse eine bedeutende Rolle der SP8-induzierten FGF8-Aktivierung in der Metastasierung von Krebs, wie wir es hier für das HB manifestieren konnten. Da unsere funktionellen Analysen auf einen signifikanten Einfluss von SP8 auf die Zellmotilität, Selbsterneuerung, Migration und Invasion mittels FGF8 hinwiesen, war es weiterhin nicht überraschend, dass langzeitinduzierte, SP8-überexprimierende Hep3B-Pool-Zellen mesenchymale Charakteristika erwarben und ein EMT-ähnliches Genexpressionsprofil aufwiesen. Es ist gemeinhin bekannt, dass die EMT-Aktivierung eine Reihe an Transkriptionsfaktoren wie ZEB1 und TWIST1 zusammen mit anderen Initiatoren wie FGFs benötigt, um das Zelladhäsionsmolekül CDH1 zu reprimieren und intermediäre Filamente wie VIM hochzuregulieren.⁶⁹ Demgemäß konnte in den Hep3B-Pool-Zellen eine stärkere Expression von *ZEB1*, *TWIST1* und *VIM* detektiert werden, während *CDH1* eine Herunterregulation zeigte. Zudem konnte auch in anderen EMT-assoziierten Genen wie *SPARC*, *SPP1*, *DLK1*, *SEMA5A*, und *CAV2*^{146-147, 199} eine signifikante Modulation identifiziert werden. Diese Resultate zusammen mit den Daten aus einer vorangegangenen Studie, die die FGF8-induzierte Akquisition der EMT in Kolonkrebs beschreibt,¹⁹³ weisen eindeutig darauf hin, dass die SP8-FGF8-Achse die Metastasierungskaskade durch EMT-Aktivierung befeuert.

Die starken anti-tumorigenen Effekte des pan SP-Transkriptionsfaktor-Inhibitors Mithramycin A (MMA) stellten einen weiteren interessanten Befund unserer Studie dar.¹⁵² MMA wurde bereits als wirkungsvolles Medikament in präklinischen Studien des Prostata-,²⁰⁰ Brust-²⁰¹ und Kolonkrebs²⁰² untersucht, in welchen Konzentrationen im Nanomolarbereich ähnlich zu unseren Konzentrationen ausreichten, um eine deutliche Wirkung zu erzielen. Zudem konnte eine starke Effizienz von MMA in der Inhibition der EMT nachgewiesen werden.²⁰³ Obwohl mit MMA kein

spezifischer SP8-Inhibitor genutzt wurde und somit der dramatische Rückgang in der Selbsterneuerungskapazität der Hepatomzellen nicht alleine auf die SP8-Inhibition projiziert werden kann, unterstützen unsere Daten deutlich seine Nützlichkeit in der Behandlung metastasierter Lebertumorentitäten. Allerdings wurde die umfassende Wirksamkeit von MMA mit seinen breiten, unspezifischen *Downstream*-Effekten bisher immer durch eine starke Toxizität in klinischen Studien begleitet.²⁰⁴ Die Entwicklung zielgerichteter Analogons wie MTM-SDK und MTM-SK mit verbessertem pharmakologischen und toxikologischen Profil²⁰⁵, sowie die Testung von Kombinationstherapieansätzen mit dem derzeitigen Standardbehandlungsregime wie dem Doxorubicin im HB²⁰¹ stellen daher vielversprechende Ansätze für die Zukunft dar. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass erhöhte Expressionswerte von SP8 eine verstärkte Zellmotilität, Invasivität und Selbsterneuerungskapazität durch die Aktivierung von FGF8 vermitteln, was eine bedeutende Rolle der SP8-FGF8-Achse in der Progression und Metastasierung maligner, pädiatrischer Lebertumoren impliziert.

5.4 MicroRNAs als prognostische Biomarker

Aufgrund ihrer bedeutenden Rolle in der posttranskriptionellen Kontrolle sind miRs in die Entwicklung und Progression vieler Krebsarten eingebunden.²⁰⁶⁻²⁰⁷ Auch in der Initiation, Progression und Metastasierung des HBs wurde den miRs bereits früh ein entscheidender Beitrag eingeräumt.²⁰⁸⁻²¹⁰ Unsere Multiomics-Studie, die eine Überexpression vier vernetzter let7-Targets in den aggressiveren G2-HBs postulierte, wies erneut auf miRs als wichtige Kontrollpunkte hin und zeigte nochmals, dass sie durch die Regulation zahlreicher Targets und damit auch einer Vielzahl unterschiedlicher molekularer Mechanismen als prognostische Biomarker interessant sind.

Im Jahr 2010 beschrieb Cairo et al. die vier-miR-Signatur, die neben dem let7-Familienmitglied let7a aus den miRs miR-373, miR-371 und miR-100 bestand, und für die Prognose des Gesamtüberlebens von HB-Patienten gute prädiktive Genauigkeit lieferte.⁵²

Um die Verlässlichkeit der vier-miR-Signatur in einer unabhängigen Kohorte von HB-Patienten zu verifizieren, bestimmten wir zunächst die Expressionswerte der vier miRs und teilten dann die Patienten in die prognostischen Subgruppen Cm1 und Cm2 entsprechend Cairo et al. ein.⁵² Die Patientenstratifizierung anhand der Expressionswerte von let7a, miR-373, miR-371 und miR-100 zeigte jedoch keine Vorhersagekraft für das Gesamtüberleben und schlug daher fehl, die Ergebnisse von Cairo et al. zu reproduzieren. Eine mögliche Erklärung dieser Unstimmigkeit könnten die Expressionswerte der einzelnen miRs liefern, die nur für miR-371 und miR-373 eine signifikante Hochregulation in den Tumoren im Vergleich zu NL zeigten, während let7a und miR-100 in den Tumoren ähnliche Werte wie in den NL-Proben aufwiesen. In diesem Zusammenhang ist es daher besonders erwähnenswert, dass sowohl miR-371 und miR-373 als

auch let7a und miR-100 in aneinandergereihten Clustern auf Chromosom 19q13.4²¹¹ beziehungsweise 11q24.1²¹² lokalisiert sind und daher generell koexprimiert werden. Übereinstimmend damit fanden wir eine signifikante Korrelation der jeweiligen zwei miRs in den zwei Clustern, die besonders für miR-371 und miR-373 sehr ausgeprägt war. Insgesamt ließ sich jedoch aussagen, dass die Vorhersagekraft der vier-miR-Signatur höchstwahrscheinlich durch die Uneindeutigkeit von let7a und miR-100 nicht positiv validiert werden konnte und daher für zukünftige Anwendungen in der Patientenstratifizierung nochmals deutlich verbessert werden muss.

MiR-483, welche durch das *MIR483*-Gen auf Chromosom 11p15.5 codiert wird und im zweiten Intron von *IGF2* lokalisiert ist, wurde bereits im Zusammenhang mit zahlreichen Pathologien dokumentiert.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ Die transkriptionelle Koregulation mit *IGF2* und die Initiation durch β -Catenin stellen zwei potentielle Mechanismen dar, die die Überexpression von miR-483 in vielen Krebsarten erklärt.¹¹⁰ Interessanterweise sind es genau die IGF2-Überexpression und die β -Catenin-Akkumulation als Folge der Wnt-Signalwegsaktivierung, die die Schlüsselfaktoren der HB-Entwicklung und Progression darstellen.^{25, 31, 41-42} Durch diese Verstrickungen und durch die positive Assoziation mit den G2-HBs schien miR-483 als potentieller Biomarker der ideale Kandidat. Da miR-483 im HB bisher nicht näher untersucht wurde, wurden sowohl das dominanteren 5'- als auch das 3'-Produkt, welches nur manchmal funktionell aktiv ist, detektiert.²¹³ In Übereinstimmung damit fanden wir in unserer Studienpopulation deutlich erhöhte Werte der 5'-Form von miR-483 im Tumorgewebe verglichen zu NL. Auch ließ sich eine Korrelation mit fortgeschrittenem Tumorstadium nach PRETEXT nachweisen, welches einen bekannten Risikofaktor des HBs repräsentiert und für PRETEXT IV deutlich erhöhte Werte aufwies.⁶³ Eine Vielzahl an Studien konnte bereits eine Assoziation der miR-483-Überexpression mit aggressiven Tumorcharakteristika und schlechtem Patientenüberleben in Lebertumoren herstellen und bekräftigten damit unsere Resultate.^{106, 109, 112, 214-215} Lediglich eine Veröffentlichung zeigte in den letzten Jahren mit der Abschwächung des Risikos einer Tumorrezidiv Gegenteiliges auf.²¹⁶

Verglichen zur initialen Gruppenzuordnung in Cm1 und Cm2 entsprechend der vier-miR-Signatur konnte durch die Integration beider Transkriptvarianten von miR-483 eine deutliche Änderung in der Gruppenallokation erzielt werden, was die Risikostratifizierung bezüglich des Gesamtüberlebens signifikant verbesserte. Da die Mitglieder der vier-miR-Signatur alle durch das MYC-Onkogen moduliert werden,²¹⁷ welches zwar entscheidend die Biologie der unreifen als Cm2 klassifizierten HBs prägt,⁵² kann wohl durch die sehr ähnlichen transkriptionellen Regulationsmechanismen die molekulare Heterogenität der HBs nicht ausreichend abgebildet werden. Das Hinzufügen von miR-483 schafft dem Abhilfe, indem es eine neue Ebene der Dysregulation im HB erfasst.

Zusammenfassend konnten wir durch unsere Daten zeigen, dass die Inklusion von miR-483 in die vier-miR-Signatur die Diskriminierung der Patienten mit guter beziehungsweise schlechter Überlebensprognose deutlich verbessert.

5.5 Klinische Implikationen und Ausblick

Eine deutliche Korrelation von klinischen Parametern mit der Proliferation beziehungsweise dem Grad der Differenzierung, wie wir sie hier für das HB beobachteten, ist häufig in soliden Tumoren auszumachen. Die Deregulation verschiedener Signalwege beeinträchtigt dabei die Fähigkeit mutierter Leberstammzellen sich zu differenzieren, was abhängig von der onkogenen Aktivierung in der Progression mehr oder minder aggressiver Neoplasien mündet.

Unsere Studienergebnisse zeigten, dass die klinische Korrelation überwiegend auf Unterschiede in der Tumorinvasivität, dem Tumorstadium und dem Gesamtüberleben basiert. Bedeutungsvollerweise konnte bereits durch den epigenetischen Fußabdruck eine Diskriminierung aggressiver Tumore mit schlechterer Prognose und ungünstigen klinischen Eigenschaften erzielt werden, die sich auch auf Transkriptomebene deutlich widerspiegelte und mit *TRIM71* einen Kandidaten offenlegte, der beide Ebenen sehr gut repräsentierte. Während durch die Heterogenität im HB die Nutzung von Standarddiagnostikverfahren wie die histopathologische Analyse in der Risikostratifizierung eher wenig geeignet ist, würde die Messung der DNA-Methylierung weniger CpGs durch Pyrosequenzierung und die Ermittlung der Expressionswerte durch quantitative PCR des *TRIM71*-Gens eine kostengünstige und schnelle Methodik liefern, den Tumorzellstatus zu charakterisieren. Erste Pyrosequenzierresultate an 32 Patienten zeigten große Übereinstimmung mit der Chip-basierten Erfassung der Methylierung und rekapitulierten die Gruppeneinteilung innerhalb weniger Stunden Arbeit. Da die Detektion der Methylierung als äußerst stabile Modifikation hervorragend als Biomarker geeignet ist, wäre eine zuverlässige Abschätzung des Diskriminierungspotentials von *TRIM71* durch weiterführende Studien an einer Vielzahl an HB-Proben als sehr sinnvoll zu erachten. Da die Erfassung der Hypomethylierung jedoch eine Leberbiopsie nötig macht, die vor der eigentlichen Tumorsektion in nur sehr seltenen Fällen vorliegt, würde andererseits die Bestimmung der Hypermethylierung, wie sie in G2-HBs in vielen Tumorsuppressorgenen zu finden war, aus Serum-DNA und damit durch ein nicht-invasives Verfahren eine noch frühere Erkennung von Hochrisiko-Patienten erlauben. Das Tumorsuppressorgen *TSYPL5* eröffnet hierfür durch seine klare Korrelation zwischen CpG-Insel-Methylierung und transkriptioneller Repression und durch seine Implikationen in der Zelldifferenzierung¹⁶⁹ vielversprechendes Potential.

Wenig überraschend war es, dass auch alle anderen Kandidatengene aus dieser Arbeit in starker Beziehung zur Entwicklung und Differenzierung stehen. So war die *TRIM71*, *LIN28B*, *HMG2* und *IGF2BP1/3*-Überexpression mit G2-HBs und damit schlechterer Prognose,

Metastasierung und multifokalem Wachstum assoziiert. TRIM71 ist für die richtige Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung durch die Blockierung von pro-Differenzierungsgenen in Stammzellen beschrieben¹⁷⁷ und verstärkt durch die Repression von Zellzyklusregulatoren die Proliferation.^{175, 218} LIN28B reguliert ebenso das Stammzellwachstum und -metabolismus und ist dafür bekannt, die let7-miR-Reifung zu inhibieren und zusammen mit HMGA2 das Selbsterneuerungspotential von Stammzellen zu steuern.²¹⁹ IGF2BP1 ist nicht nur ubiquitär während der embryonalen Entwicklung exprimiert,²²⁰ sondern reguliert auch eine Vielzahl an mRNAs, wie *MYC*, *CD44*, *PTEN* oder *MAPK4*, die wichtige Rollen in der Zellproliferation, im Gewebewachstum, der Apoptose, der Migration oder der Invasion übernehmen²²¹. Um all diese Effekte umfassend zu adressieren, könnte in HBs mit ähnlichem Expressionsprofil die Wiederherstellung der let7-Expressionslevel eine sinnvolle Behandlungsstrategie darstellen, die evaluiert werden sollte. Erst kürzlich widmete sich eine Studie dem Screening von LIN28-Inhibitoren, die die LIN28-vermittelte Oligouridylation von let7 verhindern und damit die Reifung zur funktionellen miR zulassen.²²² *In vitro*- und *in vivo*-Tests zur Wirksamkeit dieser neuen Inhibitoren im Kontext des HBs könnten wichtige neue Therapieoptionen eröffnen.

Auch miR-483 ist in zahlreiche Zelldifferenzierungsvorgänge eingebunden, indem es als β -Catenin-Effektor über ihre Targets *TP53* und *PUMA* die Apoptose beeinflusst,¹¹⁰ oder über den Abbau von *DPC4/SMAD4* Zellzyklusregulatoren reprimiert.²²³ Durch ihre Integration konnten wir das Risikostratifizierungspotential der bisherigen vier-miR-Signatur deutlich optimieren und zeigen, dass miRs vielversprechende Biomarker für die klinische Anwendung bei HB-Patienten darstellen. Für miRs ist es gemeinhin bekannt, dass sie durch Exosom-abhängige oder unabhängige Mechanismen aus vielen Zelltypen sekretiert werden und aufgrund ihrer Stabilität in Biopsiegewebe aber auch in Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel oder Tränen detektierbar sind.²²⁴ Für HB-Patienten wäre es im nächsten Schritt daher sinnvoll, ihre Nachweisbarkeit zum Beispiel in Plasmaproben zu testen und ihre Vorhersagegenauigkeit mit Gewebeproben zu vergleichen. Äußerst vielversprechend ist es, dass für das adulte HCC miR-483-5p bereits als allgemeiner Marker im Blutplasma evaluiert werden konnte.²²⁵

Weiterhin waren Hochrisiko-HBs durch eine signifikante Expression von *SP8* und *FGF8* gekennzeichnet, die neben der Metastasierung auch für eine schlechte Überlebensprognose indikativ war. Während beide Faktoren wichtige Weichen in der neuronalen Entwicklung stellen,¹⁵⁰ ist *FGF8* auch in die Leberentwicklung eingebunden²²⁶ und konnte bereits mit der Anreicherung von unipotenten Hepatoblastzellen assoziiert werden²²⁷. Die Vermittlung invasiver Charakteristika macht sie besonders als Biomarker des metastasierten HBs interessant. In diesem Zusammenhang ist es äußerst erwähnenswert, dass ein Patient mit nicht-metastasiertem HB, allerdings hohen *SP8*- und *FGF8*-Expressionswerten bei der initialen

5 DISKUSSION

Diagnose, 8 Monate nach Tumorresektion mit der Detektion von Lungenmetastasen konfrontiert war. Könnte sich dieses Ergebnis in einem größeren Patientenkollektiv bestätigen, würden sie einen wertvollen Beitrag in der früheren Detektion von Metastasen leisten. Als prognostische Biomarker könnten sie zudem auf Patienten hinweisen, die von einer aggressiveren Zusatz-Therapie mit SP-inhibierenden Medikamenten profitieren würden. Da die Behandlung der Metastasierung auch in anderen Lebertumoren weiterhin eine große Herausforderung darstellt, wäre es zudem interessant zu erfahren, ob es sich bei der Aktivierung der SP8-FGF8-Achse um ein generelles Phänomen in der Progression von Leberkrebs handelt.

Insgesamt erlaubte der Einsatz zweier Omics-Technologien durch eine vielschichtige Abbildung der molekularen Vorgänge die Identifikation progressionsrelevanter Gene im HB, die großes Potential besitzen, als neue Biomarker das klinische Patientenmanagement zu optimieren und in der Entwicklung neuer, zielgerichteter Therapieansätze zu assistieren.

6 REFERENZEN

1. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646-74.
2. Grobner, S. N.; Worst, B. C.; Weischenfeldt, J.; Buchhalter, I.; Kleinheinz, K.; Rudneva, V. A.; Johann, P. D.; Balasubramanian, G. P.; Segura-Wang, M.; Brabetz, S.; Bender, S.; Hutter, B.; Sturm, D.; Pfaff, E.; Hubschmann, D.; Zipprich, G.; Heinold, M.; Eils, J.; Lawerenz, C.; Erkek, S.; Lambo, S.; Waszak, S.; Blattmann, C.; Borkhardt, A.; Kuhlen, M.; Eggert, A.; Fulda, S.; Gessler, M.; Wegert, J.; Kappler, R.; Baumhoer, D.; Burdach, S.; Kirschner-Schwabe, R.; Kontry, U.; Kulozik, A. E.; Lohmann, D.; Hettmer, S.; Eckert, C.; Bielack, S.; Nathrath, M.; Niemeyer, C.; Richter, G. H.; Schulte, J.; Siebert, R.; Westermann, F.; Molenaar, J. J.; Vassal, G.; Witt, H.; Burkhardt, B.; Kratz, C. P.; Witt, O.; van Tilburg, C. M.; Kramm, C. M.; Fleischhack, G.; Dirksen, U.; Rutkowski, S.; Fruhwald, M.; von Hoff, K.; Wolf, S.; Klingebiel, T.; Koscielniak, E.; Landgraf, P.; Koster, J.; Resnick, A. C.; Zhang, J.; Liu, Y.; Zhou, X.; Waanders, A. J.; Zwijnenburg, D. A.; Raman, P.; Brors, B.; Weber, U. D.; Northcott, P. A.; Pajtler, K. W.; Kool, M.; Piro, R. M.; Korbel, J. O.; Schlesner, M.; Eils, R.; Jones, D. T. W.; Lichter, P.; Chavez, L.; Zapatka, M.; Pfister, S. M., The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature* **2018**, *555* (7696), 321-327.
3. Maris, J. M.; Denny, C. T., Focus on embryonal malignancies. *Cancer cell* **2002**, *2* (6), 447-50.
4. Vogelstein, B.; Papadopoulos, N.; Velculescu, V. E.; Zhou, S.; Diaz, L. A., Jr.; Kinzler, K. W., Cancer genome landscapes. *Science* **2013**, *339* (6127), 1546-58.
5. Kinderkrebsregister Deutschland, Jahresbericht 2018. www.kinderkrebsregister.de **2018**.
6. Stiller, C. A.; Pritchard, J.; Steliarova-Foucher, E., Liver cancer in European children: incidence and survival, 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer* **2006**, *42* (13), 2115-23.
7. von Schweinitz, D., Hepatoblastoma: recent developments in research and treatment. *Seminars in pediatric surgery* **2012**, *21* (1), 21-30.
8. Czauderna, P.; Lopez-Terrada, D.; Hiyama, E.; Haberle, B.; Malogolowkin, M. H.; Meyers, R. L., Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. *Curr Opin Pediatr* **2014**, *26* (1), 19-28.
9. Kingston, J. E.; Herbert, A.; Draper, G. J.; Mann, J. R., Association between hepatoblastoma and polyposis coli. *Arch Dis Child* **1983**, *58* (12), 959-62.
10. Hughes, L. J.; Michels, V. V., Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. *Am J Med Genet* **1992**, *43* (6), 1023-5.
11. Beckwith, J. B., Macroglossia, Omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism and hyperplastic viseromegaly. *Birth Defects* **1969**, *5*, 9.
12. Wiedemann, H. R., [Familial Malformation Complex with Umbilical Hernia and Macroglossia--a "New Syndrome"?]. *J Genet Hum* **1964**, *13*, 223-32.
13. Bliiek, J.; Gicquel, C.; Maas, S.; Gaston, V.; Le Bouc, Y.; Mannens, M., Epigenotyping as a tool for the prediction of tumor risk and tumor type in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS). *The Journal of pediatrics* **2004**, *145* (6), 796-9.
14. Choufani, S.; Shuman, C.; Weksberg, R., Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **2010**, *154C* (3), 343-54.
15. Finegold, M. J.; Lopez-Terrada, D. H.; Bowen, J.; Washington, M. K.; Qualman, S. J.; College of American, P., Protocol for the examination of specimens from pediatric patients with hepatoblastoma. *Arch Pathol Lab Med* **2007**, *131* (4), 520-9.
16. Heck, J. E.; Meyers, T. J.; Lombardi, C.; Park, A. S.; Cockburn, M.; Reynolds, P.; Ritz, B., Case-control study of birth characteristics and the risk of hepatoblastoma. *Cancer Epidemiol* **2013**, *37* (4), 390-5.
17. Ishak, K. G.; Glunz, P. R., Hepatoblastoma and hepatocarcinoma in infancy and childhood. Report of 47 cases. *Cancer* **1967**, *20* (3), 396-422.
18. Weinberg, A. G.; Finegold, M. J., Primary hepatic tumors of childhood. *Hum Pathol* **1983**, *14* (6), 512-37.
19. Stocker, J. T., Hepatic tumors in children. *Clin Liver Dis* **2001**, *5* (1), 259-81, viii-ix.
20. Hiyama, E., Pediatric hepatoblastoma: diagnosis and treatment. *Transl Pediatr* **2014**, *3* (4), 293-9.
21. Zhong, S.; Zhao, Y.; Fan, C., Hepatoblastoma with pure fetal epithelial differentiation in a 10-year-old boy: A rare case report and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **2018**, *97* (2), e9647.
22. Perilongo, G.; Maibach, R.; Shafford, E.; Brugieres, L.; Brock, P.; Morland, B.; de Camargo, B.; Zsiros, J.; Roebuck, D.; Zimmermann, A.; Aronson, D.; Childs, M.; Widing, E.; Laithier, V.; Plaschkes, J.; Pritchard, J.; Scopinaro, M.; MacKinlay, G.; Czauderna, P., Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard-risk hepatoblastoma. *The New England journal of medicine* **2009**, *361* (17), 1662-70.
23. Cai, Y.; Yi, M.; Chen, D.; Liu, J.; Guleng, B.; Ren, J.; Shi, H., Trefoil factor family 2 expression inhibits gastric cancer cell growth and invasion in vitro via interactions with the transcription factor Sp3. *International journal of molecular medicine* **2016**, *38* (5), 1474-1480.
24. Zsiros, J.; Maibach, R.; Shafford, E.; Brugieres, L.; Brock, P.; Czauderna, P.; Roebuck, D.; Childs, M.; Zimmermann, A.; Laithier, V.; Otte, J. B.; de Camargo, B.; MacKinlay, G.; Scopinaro, M.; Aronson, D.; Plaschkes, J.; Perilongo, G., Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: final results of the SIOPEL-3HR study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2010**, *28* (15), 2584-90.
25. Tomlinson, G. E.; Kappler, R., Genetics and epigenetics of hepatoblastoma. *Pediatric blood & cancer* **2012**, *59* (5), 785-92.

6 REFERENZEN

26. Tomlinson, G. E.; Douglass, E. C.; Pollock, B. H.; Finegold, M. J.; Schneider, N. R., Cytogenetic evaluation of a large series of hepatoblastomas: numerical abnormalities with recurring aberrations involving 1q12-q21. *Genes Chromosomes Cancer* **2005**, *44* (2), 177-84.
27. Tonk, V. S.; Wilson, K. S.; Timmons, C. F.; Schneider, N. R., Trisomy 2, trisomy 20, and del(17p) as sole chromosomal abnormalities in three cases of hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **1994**, *11* (3), 199-202.
28. Schneider, N. R.; Cooley, L. D.; Finegold, M. J.; Douglass, E. C.; Tomlinson, G. E., The first recurring chromosome translocation in hepatoblastoma: der(4)t(1;4)(q12;q34). *Genes Chromosomes Cancer* **1997**, *19* (4), 291-4.
29. Rodrigues, T. C.; Fidalgo, F.; da Costa, C. M.; Ferreira, E. N.; da Cunha, I. W.; Carraro, D. M.; Krepschi, A. C.; Rosenberg, C., Upregulated genes at 2q24 gains as candidate oncogenes in hepatoblastomas. *Future Oncol* **2014**, *10* (15), 2449-57.
30. Cairo, S.; Armengol, C.; De Reynies, A.; Wei, Y.; Thomas, E.; Renard, C. A.; Goga, A.; Balakrishnan, A.; Semeraro, M.; Gresh, L.; Pontoglio, M.; Strick-Marchand, H.; Levillayer, F.; Nouet, Y.; Rickman, D.; Gauthier, F.; Branchereau, S.; Brugieres, L.; Laithier, V.; Bouvier, R.; Boman, F.; Basso, G.; Michiels, J. F.; Hofman, P.; Arbez-Gindre, F.; Jouan, H.; Rousselet-Chapeau, M. C.; Berrebi, D.; Marcellin, L.; Plenat, F.; Zachar, D.; Joubert, M.; Selves, J.; Pasquier, D.; Bioulac-Sage, P.; Grotzer, M.; Childs, M.; Fabre, M.; Buendia, M. A., Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer cell* **2008**, *14* (6), 471-84.
31. Eichenmuller, M.; Trippel, F.; Kreuder, M.; Beck, A.; Schwarzmayr, T.; Haberle, B.; Cairo, S.; Leuschner, I.; von Schweinitz, D.; Strom, T. M.; Kappler, R., The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. *J Hepatol* **2014**, *61* (6), 1312-20.
32. Sumazin, P.; Chen, Y.; Trevino, L. R.; Sarabia, S. F.; Hampton, O. A.; Patel, K.; Mistretta, T. A.; Zorman, B.; Thompson, P.; Heczey, A.; Comerford, S.; Wheeler, D. A.; Chintagumpala, M.; Meyers, R.; Rakheja, D.; Finegold, M. J.; Tomlinson, G.; Parsons, D. W.; Lopez-Terrada, D., Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups. *Hepatology* **2017**, *65* (1), 104-121.
33. Koch, A.; Denkhäus, D.; Albrecht, S.; Leuschner, I.; von Schweinitz, D.; Pietsch, T., Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer research* **1999**, *59* (2), 269-73.
34. Udatsu, Y.; Kusafuka, T.; Kuroda, S.; Miao, J.; Okada, A., High frequency of beta-catenin mutations in hepatoblastoma. *Pediatr Surg Int* **2001**, *17* (7), 508-12.
35. Oda, H.; Imai, Y.; Nakatsuru, Y.; Hata, J.; Ishikawa, T., Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. *Cancer research* **1996**, *56* (14), 3320-3.
36. Koch, A.; Weber, N.; Waha, A.; Hartmann, W.; Denkhäus, D.; Behrens, J.; Birchmeier, W.; von Schweinitz, D.; Pietsch, T., Mutations and elevated transcriptional activity of conductin (AXIN2) in hepatoblastomas. *J Pathol* **2004**, *204* (5), 546-54.
37. Taniguchi, K.; Roberts, L. R.; Aderca, I. N.; Dong, X.; Qian, C.; Murphy, L. M.; Nagorney, D. M.; Burgart, L. J.; Roche, P. C.; Smith, D. I.; Ross, J. A.; Liu, W., Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* **2002**, *21* (31), 4863-71.
38. Hartmann, W.; Kuchler, J.; Koch, A.; Friedrichs, N.; Waha, A.; Endl, E.; Czerwitzki, J.; Metzger, D.; Steiner, S.; Wurst, P.; Leuschner, I.; von Schweinitz, D.; Buettner, R.; Pietsch, T., Activation of phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signaling is essential in hepatoblastoma survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2009**, *15* (14), 4538-45.
39. Arai, Y.; Honda, S.; Haruta, M.; Kasai, F.; Fujiwara, Y.; Ohshima, J.; Sasaki, F.; Nakagawara, A.; Horie, H.; Yamaoka, H.; Hiyama, E.; Kaneko, Y., Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **2010**, *49* (7), 596-609.
40. Zatkova, A.; Rouillard, J. M.; Hartmann, W.; Lamb, B. J.; Kuick, R.; Eckart, M.; von Schweinitz, D.; Koch, A.; Fonatsch, C.; Pietsch, T.; Hanash, S. M.; Wimmer, K., Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **2004**, *39* (2), 126-37.
41. Gray, S. G.; Eriksson, T.; Ekstrom, C.; Holm, S.; von Schweinitz, D.; Kogner, P.; Sandstedt, B.; Pietsch, T.; Ekstrom, T. J., Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas. *British journal of cancer* **2000**, *82* (9), 1561-7.
42. Li, X.; Adam, G.; Cui, H.; Sandstedt, B.; Ohlsson, R.; Ekstrom, T. J., Expression, promoter usage and parental imprinting status of insulin-like growth factor II (IGF2) in human hepatoblastoma: uncoupling of IGF2 and H19 imprinting. *Oncogene* **1995**, *11* (2), 221-9.
43. Biran, H.; Ariel, I.; de Groot, N.; Shani, A.; Hochberg, A., Human imprinted genes as oncodevelopmental markers. *Tumour Biol* **1994**, *15* (3), 123-34.
44. Luo, J. H.; Ren, B.; Keryanov, S.; Tseng, G. C.; Rao, U. N.; Monga, S. P.; Strom, S.; Demetris, A. J.; Nalesnik, M.; Yu, Y. P.; Ranganathan, S.; Michalopoulos, G. K., Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Hepatology* **2006**, *44* (4), 1012-24.
45. Hubertus, J.; Lacher, M.; Rottenkolber, M.; Müller-Hocker, J.; Berger, M.; Stehr, M.; von Schweinitz, D.; Kappler, R., Altered expression of imprinted genes in Wilms tumors. *Oncol Rep* **2011**, *25* (3), 817-23.
46. Dekel, B.; Metsuyanin, S.; Schmidt-Ott, K. M.; Fridman, E.; Jacob-Hirsch, J.; Simon, A.; Pinthus, J.; Mor, Y.; Barasch, J.; Amariglio, N.; Reisner, Y.; Kaminski, N.; Rechavi, G., Multiple imprinted and stemness genes provide

6 REFERENZEN

- a link between normal and tumor progenitor cells of the developing human kidney. *Cancer research* **2006**, *66* (12), 6040-9.
47. Carrillo-Reixach, J.; Torrens, L.; Simon-Coma, M.; Royo, L.; Domingo-Sabat, M.; Abril-Fornaguera, J.; Akers, N.; Sala, M.; Ragull, S.; Arnal, M.; Villalmanzo, N.; Cairo, S.; Villanueva, A.; Kappler, R.; Garrido, M.; Guerra, L.; Sabado, C.; Guillen, G.; Mallo, M.; Pineyro, D.; Vazquez-Vitali, M.; Kuchuk, O.; Mateos, M. E.; Ramirez, G.; Santamaria, M. L.; Mozo, Y.; Soriano, A.; Grotzer, M.; Branchereau, S.; Garcia de Andoin, N.; Lopez-Ibor, B.; Lopez-Almaraz, R.; Salinas, J. A.; Torres, B.; Hernandez, F.; Uriz, J. J.; Fabre, M.; Blanco, J.; Paris, C.; Bajciová, V.; Laureys, G.; Masnou, H.; Clos, A.; Belendez, C.; Guettier, C.; Sumoy, L.; Planas, R.; Jorda, M.; Nonell, L.; Czauderna, P.; Morland, B.; Sia, D.; Losic, B.; Buendia, M. A.; Sarrias, M. R.; Llovet, J. M.; Armengol, C., Epigenetic footprint enables molecular risk stratification of hepatoblastoma with clinical implications. *J Hepatol* **2020**.
48. Rumbajan, J. M.; Maeda, T.; Souzaki, R.; Mitsui, K.; Higashimoto, K.; Nakabayashi, K.; Yatsuki, H.; Nishioka, K.; Harada, R.; Aoki, S.; Kohashi, K.; Oda, Y.; Hata, K.; Saji, T.; Taguchi, T.; Tajiri, T.; Soejima, H.; Joh, K., Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma. *BMC cancer* **2013**, *13*, 608.
49. Adesina, A. M.; Lopez-Terrada, D.; Wong, K. K.; Gunaratne, P.; Nguyen, Y.; Pulliam, J.; Margolin, J.; Finegold, M. J., Gene expression profiling reveals signatures characterizing histologic subtypes of hepatoblastoma and global deregulation in cell growth and survival pathways. *Hum Pathol* **2009**, *40* (6), 843-53.
50. Hooks, K. B.; Audoux, J.; Fazli, H.; Lesjean, S.; Ernault, T.; Dugot-Senant, N.; Leste-Lasserre, T.; Hagedorn, M.; Rousseau, B.; Danet, C.; Branchereau, S.; Brugieres, L.; Taque, S.; Guettier, C.; Fabre, M.; Rullier, A.; Buendia, M. A.; Commes, T.; Grosset, C. F.; Raymond, A. A., New insights into diagnosis and therapeutic options for proliferative hepatoblastoma. *Hepatology* **2018**, *68* (1), 89-102.
51. Kats, D.; Ricker, C. A.; Berlow, N. E.; Noblet, B.; Nicolle, D.; Mevel, K.; Branchereau, S.; Judde, J. G.; Stiverson, C. D.; Stiverson, C. L.; Svalina, M. N.; Settelmeier, T.; Matlock, K.; Lathara, M.; Mussini, C.; Geller, J. I.; Noakes, C.; Sloma, I.; Bharathy, N.; Cairo, S.; Keller, C., Volasertib preclinical activity in high-risk hepatoblastoma. *Oncotarget* **2019**, *10* (60), 6403-6417.
52. Cairo, S.; Wang, Y.; de Reynies, A.; Duroure, K.; Dahan, J.; Redon, M. J.; Fabre, M.; McClelland, M.; Wang, X. W.; Croce, C. M.; Buendia, M. A., Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107* (47), 20471-6.
53. Nguyen, L. H.; Robinton, D. A.; Seligson, M. T.; Wu, L.; Li, L.; Rakheja, D.; Comerford, S. A.; Ramezani, S.; Sun, X.; Parikh, M. S.; Yang, E. H.; Powers, J. T.; Shinoda, G.; Shah, S. P.; Hammer, R. E.; Daley, G. Q.; Zhu, H., Lin28b is sufficient to drive liver cancer and necessary for its maintenance in murine models. *Cancer cell* **2014**, *26* (2), 248-61.
54. Meyers, R. L.; Tiao, G.; de Ville de Goyet, J.; Superina, R.; Aronson, D. C., Hepatoblastoma state of the art: pre-treatment extent of disease, surgical resection guidelines and the role of liver transplantation. *Curr Opin Pediatr* **2014**, *26* (1), 29-36.
55. Otte, J. B.; Meyers, R., PLUTO first report. *Pediatr Transplant* **2010**, *14* (7), 830-5.
56. Malogolowkin, M. H.; Katzenstein, H. M.; Krailo, M.; Meyers, R. L., Treatment of hepatoblastoma: the North American cooperative group experience. *Front Biosci (Elite Ed)* **2012**, *4*, 1717-23.
57. Guerin, F.; Gauthier, F.; Martelli, H.; Fabre, M.; Baujard, C.; Franchi, S.; Branchereau, S., Outcome of central hepatectomy for hepatoblastomas. *Journal of pediatric surgery* **2010**, *45* (3), 555-63.
58. Meyers, R. L.; Rowland, J. R.; Krailo, M.; Chen, Z.; Katzenstein, H. M.; Malogolowkin, M. H., Predictive power of pretreatment prognostic factors in children with hepatoblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatric blood & cancer* **2009**, *53* (6), 1016-22.
59. Fuchs, J.; Rydzynski, J.; Von Schweinitz, D.; Bode, U.; Hecker, H.; Weinel, P.; Burger, D.; Harms, D.; Erttmann, R.; Oldhafer, K.; Mildenerger, H.; Study Committee of the Cooperative Pediatric Liver Tumor Study Hb 94 for the German Society for Pediatric, O.; Hematology, Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma: a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94. *Cancer* **2002**, *95* (1), 172-82.
60. Czauderna, P.; Haerberle, B.; Hiyama, E.; Rangaswami, A.; Krailo, M.; Maibach, R.; Rinaldi, E.; Feng, Y.; Aronson, D.; Malogolowkin, M.; Yoshimura, K.; Leuschner, I.; Lopez-Terrada, D.; Hishiki, T.; Perilongo, G.; von Schweinitz, D.; Schmid, I.; Watanabe, K.; Derosa, M.; Meyers, R., 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* **2016**, *52*, 92-101.
61. Meyers, R. L.; Maibach, R.; Hiyama, E.; Haerberle, B.; Krailo, M.; Rangaswami, A.; Aronson, D. C.; Malogolowkin, M. H.; Perilongo, G.; von Schweinitz, D.; Ansari, M.; Lopez-Terrada, D.; Tanaka, Y.; Alaggio, R.; Leuschner, I.; Hishiki, T.; Schmid, I.; Watanabe, K.; Yoshimura, K.; Feng, Y.; Rinaldi, E.; Saraceno, D.; Derosa, M.; Czauderna, P., Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration. *The Lancet. Oncology* **2017**, *18* (1), 122-131.
62. Massague, J.; Obenauf, A. C., Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* **2016**, *529* (7586), 298-306.
63. Maibach, R.; Roebuck, D.; Brugieres, L.; Capra, M.; Brock, P.; Dall'Igna, P.; Otte, J. B.; De Camargo, B.; Zsiros, J.; Zimmermann, A.; Aronson, D.; Childs, M.; Scopinaro, M.; Morland, B.; Plaschkes, J.; Czauderna, P.; Perilongo, G., Prognostic stratification for children with hepatoblastoma: the SIOPEL experience. *Eur J Cancer* **2012**, *48* (10), 1543-9.

6 REFERENZEN

64. Chambers, A. F.; Groom, A. C.; MacDonald, I. C., Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews. Cancer* **2002**, *2* (8), 563-72.
65. Lambert, A. W.; Pattabiraman, D. R.; Weinberg, R. A., Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* **2017**, *168* (4), 670-691.
66. Valastyan, S.; Weinberg, R. A., Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **2011**, *147* (2), 275-92.
67. Steeg, P. S., Targeting metastasis. *Nature reviews. Cancer* **2016**, *16* (4), 201-18.
68. Kalluri, R.; Weinberg, R. A., The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **2009**, *119* (6), 1420-8.
69. Thiery, J. P.; Acloque, H.; Huang, R. Y.; Nieto, M. A., Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **2009**, *139* (5), 871-90.
70. Peinado, H.; Portillo, F.; Cano, A., Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* **2004**, *48* (5-6), 365-75.
71. Huber, M. A.; Kraut, N.; Beug, H., Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology* **2005**, *17* (5), 548-58.
72. Zeisberg, M.; Neilson, E. G., Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* **2009**, *119* (6), 1429-37.
73. Diepenbruck, M.; Christofori, G., Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Current opinion in cell biology* **2016**, *43*, 7-13.
74. Nieto, M. A., Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* **2013**, *342* (6159), 1234850.
75. Shibue, T.; Weinberg, R. A., EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature reviews. Clinical oncology* **2017**, *14* (10), 611-629.
76. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R., Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15* (3), 178-96.
77. Nieto, M. A.; Cano, A., The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol* **2012**, *22* (5-6), 361-8.
78. Peinado, H.; Olmeda, D.; Cano, A., Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature reviews. Cancer* **2007**, *7* (6), 415-28.
79. Tiwari, N.; Tiwari, V. K.; Waldmeier, L.; Balwiercz, P. J.; Arnold, P.; Pachkov, M.; Meyer-Schaller, N.; Schubeler, D.; van Nimwegen, E.; Christofori, G., Sox4 is a master regulator of epithelial-mesenchymal transition by controlling Ezh2 expression and epigenetic reprogramming. *Cancer cell* **2013**, *23* (6), 768-83.
80. Guo, W.; Keckesova, Z.; Donaher, J. L.; Shibue, T.; Tischler, V.; Reinhardt, F.; Itzkovitz, S.; Noske, A.; Zurrer-Hardi, U.; Bell, G.; Tam, W. L.; Mani, S. A.; van Oudenaarden, A.; Weinberg, R. A., Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* **2012**, *148* (5), 1015-28.
81. Tiwari, N.; Meyer-Schaller, N.; Arnold, P.; Antoniadis, H.; Pachkov, M.; van Nimwegen, E.; Christofori, G., Klf4 is a transcriptional regulator of genes critical for EMT, including Jnk1 (Mapk8). *PLoS One* **2013**, *8* (2), e57329.
82. Mani, S. A.; Yang, J.; Brooks, M.; Schwanning, G.; Zhou, A.; Miura, N.; Kutok, J. L.; Hartwell, K.; Richardson, A. L.; Weinberg, R. A., Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104* (24), 10069-74.
83. Bakiri, L.; Macho-Maschler, S.; Cusic, I.; Niemiec, J.; Guio-Carrion, A.; Hasenfuss, S. C.; Eger, A.; Muller, M.; Beug, H.; Wagner, E. F., Fra-1/AP-1 induces EMT in mammary epithelial cells by modulating Zeb1/2 and TGFbeta expression. *Cell Death Differ* **2015**, *22* (2), 336-50.
84. Diepenbruck, M.; Waldmeier, L.; Ivanek, R.; Berninger, P.; Arnold, P.; van Nimwegen, E.; Christofori, G., Tead2 expression levels control the subcellular distribution of Yap and Taz, zyxin expression and epithelial-mesenchymal transition. *Journal of cell science* **2014**, *127* (Pt 7), 1523-36.
85. Bracken, C. P.; Gregory, P. A.; Kolesnikoff, N.; Bert, A. G.; Wang, J.; Shannon, M. F.; Goodall, G. J., A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer research* **2008**, *68* (19), 7846-54.
86. Bracken, C. P.; Li, X.; Wright, J. A.; Lawrence, D. M.; Pillman, K. A.; Salmanidis, M.; Anderson, M. A.; Dredge, B. K.; Gregory, P. A.; Tsykin, A.; Neilsen, C.; Thomson, D. W.; Bert, A. G.; Leerberg, J. M.; Yap, A. S.; Jensen, K. B.; Khew-Goodall, Y.; Goodall, G. J., Genome-wide identification of miR-200 targets reveals a regulatory network controlling cell invasion. *EMBO J* **2014**, *33* (18), 2040-56.
87. Brabletz, S.; Brabletz, T., The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep* **2010**, *11* (9), 670-7.
88. Zavadil, J.; Narasimhan, M.; Blumenberg, M.; Schneider, R. J., Transforming growth factor-beta and microRNA:mRNA regulatory networks in epithelial plasticity. *Cells Tissues Organs* **2007**, *185* (1-3), 157-61.
89. Kong, W.; Yang, H.; He, L.; Zhao, J. J.; Coppola, D.; Dalton, W. S.; Cheng, J. Q., MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* **2008**, *28* (22), 6773-84.
90. Gregory, P. A.; Bert, A. G.; Paterson, E. L.; Barry, S. C.; Tsykin, A.; Farshid, G.; Vadas, M. A.; Khew-Goodall, Y.; Goodall, G. J., The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* **2008**, *10* (5), 593-601.

6 REFERENZEN

91. Diaz-Martin, J.; Diaz-Lopez, A.; Moreno-Bueno, G.; Castilla, M. A.; Rosa-Rosa, J. M.; Cano, A.; Palacios, J., A core microRNA signature associated with inducers of the epithelial-to-mesenchymal transition. *J Pathol* **2014**, *232* (3), 319-29.
92. Korpál, M.; Lee, E. S.; Hu, G.; Kang, Y., The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283* (22), 14910-4.
93. Burk, U.; Schubert, J.; Wellner, U.; Schmalhofer, O.; Vincan, E.; Spaderna, S.; Brabletz, T., A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* **2008**, *9* (6), 582-9.
94. Zucchini-Pascal, N.; Peyre, L.; Rahmani, R., Crosstalk between beta-catenin and snail in the induction of epithelial to mesenchymal transition in hepatocarcinoma: role of the ERK1/2 pathway. *Int J Mol Sci* **2013**, *14* (10), 20768-92.
95. Chen, L.; Tian, X.; Gong, W.; Sun, B.; Li, G.; Liu, D.; Guo, P.; He, Y.; Chen, Z.; Xia, Y.; Song, T.; Guo, H., Periostin mediates epithelial-mesenchymal transition through the MAPK/ERK pathway in hepatoblastoma. *Cancer Biol Med* **2019**, *16* (1), 89-100.
96. Fu, X.; Cui, P.; Chen, F.; Xu, J.; Gong, L.; Jiang, L.; Zhang, D.; Xiao, Y., Thymosin beta4 promotes hepatoblastoma metastasis via the induction of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Med Rep* **2015**, *12* (1), 127-32.
97. Chen, C.; Liang, Q. Y.; Chen, H. K.; Wu, P. F.; Feng, Z. Y.; Ma, X. M.; Wu, H. R.; Zhou, G. Q., DRAM1 regulates the migration and invasion of hepatoblastoma cells via autophagy-EMT pathway. *Oncol Lett* **2018**, *16* (2), 2427-2433.
98. Bergstrand, C. G.; Czar, B., Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scand J Clin Lab Invest* **1956**, *8* (2), 174.
99. Calaminus, G.; Vesterling-Horner, D.; Bokkerink, J. P.; Gardner, H.; Gunther, G.; Haas, H. J.; Jurgens, H.; Teske, C.; Gobel, U., [The prognostic significance of serum alpha 1-fetoprotein in children and adolescents with malignant extracranial non-testicular germ cell tumors]. *Klin Padiatr* **1991**, *203* (4), 246-50.
100. Ikeda, H.; Sato, Y.; Yoneda, N.; Harada, K.; Sasaki, M.; Kitamura, S.; Sudo, Y.; Ooi, A.; Nakanuma, Y., alpha-Fetoprotein-producing gastric carcinoma and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma show similar morphology but different histogenesis with respect to SALL4 expression. *Hum Pathol* **2012**, *43* (11), 1955-63.
101. Lopez-Terrada, D.; Alaggio, R.; de Davila, M. T.; Czauderna, P.; Hiyama, E.; Katzenstein, H.; Leuschner, I.; Malogolowkin, M.; Meyers, R.; Ranganathan, S.; Tanaka, Y.; Tomlinson, G.; Fabre, M.; Zimmermann, A.; Finegold, M. J.; Children's Oncology Group Liver Tumor, C., Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium. *Mod Pathol* **2014**, *27* (3), 472-91.
102. Fukuzawa, H.; Urushihara, N.; Fukumoto, K.; Mitsunaga, M.; Watanabe, K.; Aoba, T.; Yamoto, S.; Miyake, H.; Hasegawa, S., Can we predict the prognosis of resectable hepatoblastoma from serum alpha-fetoprotein response during preoperative chemotherapy? *Pediatr Surg Int* **2012**, *28* (9), 887-91.
103. Gyugos, M.; Lendvai, G.; Kenessey, I.; Schlachter, K.; Halasz, J.; Nagy, P.; Garami, M.; Jakab, Z.; Schaff, Z.; Kiss, A., MicroRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **2014**, *464* (4), 419-27.
104. von Frowein, J.; Pagel, P.; Kappler, R.; von Schweinitz, D.; Roscher, A.; Schmid, I., MicroRNA-492 is processed from the keratin 19 gene and up-regulated in metastatic hepatoblastoma. *Hepatology* **2011**, *53* (3), 833-42.
105. Jiao, C.; Zhu, A.; Jiao, X.; Ge, J.; Xu, X., Combined low miR-34s are associated with unfavorable prognosis in children with hepatoblastoma: A Chinese population-based study. *Journal of pediatric surgery* **2016**, *51* (8), 1355-61.
106. Ma, N.; Li, F.; Li, D.; Hui, Y.; Wang, X.; Qiao, Y.; Zhang, Y.; Xiang, Y.; Zhou, J.; Zhou, L.; Zheng, X.; Gao, X., Igf2-derived intronic miR-483 promotes mouse hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Molecular and cellular biochemistry* **2012**, *361* (1-2), 337-43.
107. Han, K.; Gennarino, V. A.; Lee, Y.; Pang, K.; Hashimoto-Torii, K.; Choufani, S.; Raju, C. S.; Oldham, M. C.; Weksberg, R.; Rakic, P.; Liu, Z.; Zoghbi, H. Y., Human-specific regulation of MeCP2 levels in fetal brains by microRNA miR-483-5p. *Genes Dev* **2013**, *27* (5), 485-90.
108. Wang, L.; Shi, M.; Hou, S.; Ding, B.; Liu, L.; Ji, X.; Zhang, J.; Deng, Y., MiR-483-5p suppresses the proliferation of glioma cells via directly targeting ERK1. *FEBS Lett* **2012**, *586* (9), 1312-7.
109. Veronese, A.; Lupini, L.; Consiglio, J.; Visone, R.; Ferracin, M.; Fornari, F.; Zanasi, N.; Alder, H.; D'Elia, G.; Gramantieri, L.; Bolondi, L.; Lanza, G.; Querzoli, P.; Angioni, A.; Croce, C. M.; Negrini, M., Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. *Cancer research* **2010**, *70* (8), 3140-9.
110. Veronese, A.; Visone, R.; Consiglio, J.; Acunzo, M.; Lupini, L.; Kim, T.; Ferracin, M.; Lovat, F.; Miotto, E.; Balatti, V.; D'Abundo, L.; Gramantieri, L.; Bolondi, L.; Pekarsky, Y.; Perrotti, D.; Negrini, M.; Croce, C. M., Mutated beta-catenin evades a microRNA-dependent regulatory loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108* (12), 4840-5.
111. Liu, M.; Roth, A.; Yu, M.; Morris, R.; Bersani, F.; Rivera, M. N.; Lu, J.; Shioda, T.; Vasudevan, S.; Ramaswamy, S.; Maheswaran, S.; Diederichs, S.; Haber, D. A., The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal promoters and enhances tumorigenesis. *Genes Dev* **2013**, *27* (23), 2543-8.

6 REFERENZEN

112. Lu, X. Y.; Chen, D.; Gu, X. Y.; Ding, J.; Zhao, Y. J.; Zhao, Q.; Yao, M.; Chen, Z.; He, X. H.; Cong, W. M., Predicting Value of ALCAM as a Target Gene of microRNA-483-5p in Patients with Early Recurrence in Hepatocellular Carcinoma. *Front Pharmacol* **2017**, *8*, 973.
113. Balzeau, J.; Menezes, M. R.; Cao, S.; Hagan, J. P., The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Front Genet* **2017**, *8*, 31.
114. Pietsch, T.; Fonatsch, C.; Albrecht, S.; Maschek, H.; Wolf, H. K.; von Schweinitz, D., Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma. *Lab Invest* **1996**, *74* (4), 809-18.
115. Milona, M. A.; Gough, J. E.; Edgar, A. J., Genomic structure and cloning of two transcript isoforms of human Sp8. *BMC genomics* **2004**, *5*, 86.
116. Morita, S.; Noguchi, H.; Horii, T.; Nakabayashi, K.; Kimura, M.; Okamura, K.; Sakai, A.; Nakashima, H.; Hata, K.; Nakashima, K.; Hatada, I., Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nature biotechnology* **2016**, *34* (10), 1060-1065.
117. Jackstadt, R.; Roh, S.; Neumann, J.; Jung, P.; Hoffmann, R.; Horst, D.; Berens, C.; Bornkamm, G. W.; Kirchner, T.; Menssen, A.; Hermeking, H., AP4 is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer. *J Exp Med* **2013**, *210* (7), 1331-50.
118. Haeussler, M.; Schonig, K.; Eckert, H.; Eschstruth, A.; Mianne, J.; Renaud, J. B.; Schneider-Maunoury, S.; Shkumatava, A.; Teboul, L.; Kent, J.; Joly, J. S.; Concordet, J. P., Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome biology* **2016**, *17* (1), 148.
119. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T., Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* **2003**, *13* (11), 2498-504.
120. Dennis, G., Jr.; Sherman, B. T.; Hosack, D. A.; Yang, J.; Gao, W.; Lane, H. C.; Lempicki, R. A., DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome biology* **2003**, *4* (5), P3.
121. Team, R. C. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich, 2014.
122. Aryee, M. J.; Jaffe, A. E.; Corrada-Bravo, H.; Ladd-Acosta, C.; Feinberg, A. P.; Hansen, K. D.; Irizarry, R. A., Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics* **2014**, *30* (10), 1363-9.
123. Touleimat, N.; Tost, J., Complete pipeline for Infinium((R)) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics* **2012**, *4* (3), 325-41.
124. Leek, J. T.; Johnson, W. E.; Parker, H. S.; Jaffe, A. E.; Storey, J. D., The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* **2012**, *28* (6), 882-3.
125. Dobin, A.; Davis, C. A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T. R., STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29* (1), 15-21.
126. Anders, S.; Pyl, P. T.; Huber, W., HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **2015**, *31* (2), 166-9.
127. Love, M. I.; Huber, W.; Anders, S., Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* **2014**, *15* (12), 550.
128. Pfaffl, M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **2001**, *29* (9), e45.
129. McCarthy, D. J.; Chen, Y.; Smyth, G. K., Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic acids research* **2012**, *40* (10), 4288-97.
130. Heyn, H.; Esteller, M., DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nature reviews. Genetics* **2012**, *13* (10), 679-92.
131. Villanueva, A.; Portela, A.; Sayols, S.; Battiston, C.; Hoshida, Y.; Mendez-Gonzalez, J.; Imbeaud, S.; Letouze, E.; Hernandez-Gea, V.; Cornella, H.; Pinyol, R.; Sole, M.; Fuster, J.; Zucman-Rossi, J.; Mazzaferro, V.; Esteller, M.; Llovet, J. M.; Consortium, H., DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2015**, *61* (6), 1945-56.
132. Hinoue, T.; Weisenberger, D. J.; Lange, C. P.; Shen, H.; Byun, H. M.; Van Den Berg, D.; Malik, S.; Pan, F.; Noushmehr, H.; van Dijk, C. M.; Tollenaar, R. A.; Laird, P. W., Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome research* **2012**, *22* (2), 271-82.
133. Schwalbe, E. C.; Williamson, D.; Lindsey, J. C.; Hamilton, D.; Ryan, S. L.; Megahed, H.; Garami, M.; Hauser, P.; Dembowska-Baginska, B.; Perek, D.; Northcott, P. A.; Taylor, M. D.; Taylor, R. E.; Ellison, D. W.; Bailey, S.; Clifford, S. C., DNA methylation profiling of medulloblastoma allows robust subclassification and improved outcome prediction using formalin-fixed biopsies. *Acta Neuropathol* **2013**, *125* (3), 359-71.
134. Maschietto, M.; Rodrigues, T. C.; Kashiwabara, A. Y.; de Araujo, E. S. S.; Marques Aguiar, T. F.; da Costa, C. M. L.; da Cunha, I. W.; Dos Reis Vasques, L.; Cypriano, M.; Brentani, H.; de Toledo, S. R. C.; Pearson, P. L.; Carraro, D. M.; Rosenberg, C.; Krepschi, A. C. V., DNA methylation landscape of hepatoblastomas reveals arrest at early stages of liver differentiation and cancer-related alterations. *Oncotarget* **2017**, *8* (58), 97871-97889.
135. Cheng, Y.; Zhang, C.; Zhao, J.; Wang, C.; Xu, Y.; Han, Z.; Jiang, G.; Guo, X.; Li, R.; Bu, X.; Wu, M.; Wei, L., Correlation of CpG island methylator phenotype with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol* **2010**, *88* (1), 112-7.

6 REFERENZEN

136. Li, B.; Liu, W.; Wang, L.; Li, M.; Wang, J.; Huang, L.; Huang, P.; Yuan, Y., CpG island methylator phenotype associated with tumor recurrence in tumor-node-metastasis stage I hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* **2010**, *17* (7), 1917-26.
137. Honda, S.; Miyagi, H.; Suzuki, H.; Minato, M.; Haruta, M.; Kaneko, Y.; Hatanaka, K. C.; Hiyama, E.; Kamijo, T.; Okada, T.; Taketomi, A., RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int* **2013**, *29* (11), 1147-52.
138. Honda, S.; Haruta, M.; Sugawara, W.; Sasaki, F.; Ohira, M.; Matsunaga, T.; Yamaoka, H.; Horie, H.; Ohnuma, N.; Nakagawara, A.; Hiyama, E.; Todo, S.; Kaneko, Y., The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *International journal of cancer* **2008**, *123* (5), 1117-25.
139. Sheaffer, K. L.; Elliott, E. N.; Kaestner, K. H., DNA Hypomethylation Contributes to Genomic Instability and Intestinal Cancer Initiation. *Cancer Prev Res (Phila)* **2016**, *9* (7), 534-46.
140. Meng, H.; Cao, Y.; Qin, J.; Song, X.; Zhang, Q.; Shi, Y.; Cao, L., DNA methylation, its mediators and genome integrity. *Int J Biol Sci* **2015**, *11* (5), 604-17.
141. Busch, B.; Bley, N.; Muller, S.; Glass, M.; Misiak, D.; Lederer, M.; Vetter, M.; Strauss, H. G.; Thomssen, C.; Huttelmaier, S., The oncogenic triangle of HMGA2, LIN28B and IGF2BP1 antagonizes tumor-suppressive actions of the let-7 family. *Nucleic acids research* **2016**, *44* (8), 3845-64.
142. Armand-Labit, V.; Pradines, A., Circulating cell-free microRNAs as clinical cancer biomarkers. *Biomolecular concepts* **2017**.
143. Guo, J.; Yang, Z.; Zhou, H.; Yue, J.; Mu, T.; Zhang, Q.; Bi, X., Upregulation of DKK3 by miR-483-3p plays an important role in the chemoprevention of colorectal cancer mediated by black raspberry anthocyanins. *Mol Carcinog* **2020**, *59* (2), 168-178.
144. Chaffer, C. L.; Weinberg, R. A., A perspective on cancer cell metastasis. *Science* **2011**, *331* (6024), 1559-64.
145. Appanah, R.; Dickerson, D. R.; Goyal, P.; Groudine, M.; Lorincz, M. C., An unmethylated 3' promoter-proximal region is required for efficient transcription initiation. *PLoS genetics* **2007**, *3* (2), e27.
146. Robert, G.; Gaggioli, C.; Bailet, O.; Chavey, C.; Abbe, P.; Aberdam, E.; Sabatie, E.; Cano, A.; Garcia de Herreros, A.; Ballotti, R.; Tartare-Deckert, S., SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* **2006**, *66* (15), 7516-23.
147. Xu, C.; Sun, L.; Jiang, C.; Zhou, H.; Gu, L.; Liu, Y.; Xu, Q., SPP1, analyzed by bioinformatics methods, promotes the metastasis in colorectal cancer by activating EMT pathway. *Biomed Pharmacother* **2017**, *91*, 1167-1177.
148. Benthani, F. A.; Herrmann, D.; Tran, P. N.; Pangon, L.; Lucas, M. C.; Allam, A. H.; Currey, N.; Al-Sohaily, S.; Giry-Laterriere, M.; Warusavitarne, J.; Timpson, P.; Kohonen-Corish, M. R. J., 'MCC' protein interacts with E-cadherin and beta-catenin strengthening cell-cell adhesion of HCT116 colon cancer cells. *Oncogene* **2018**, *37* (5), 663-672.
149. Mattila, M. M.; Harkonen, P. L., Role of fibroblast growth factor 8 in growth and progression of hormonal cancer. *Cytokine & growth factor reviews* **2007**, *18* (3-4), 257-66.
150. Sahara, S.; Kawakami, Y.; Izpisua Belmonte, J.; O'Leary, D. D. M., Sp8 exhibits reciprocal induction with Fgf8 but has an opposing effect on anterior-posterior cortical area patterning. *Neural Development* **2007**, *2* (1), 10.
151. Larson, M. H.; Gilbert, L. A.; Wang, X.; Lim, W. A.; Weissman, J. S.; Qi, L. S., CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature protocols* **2013**, *8* (11), 2180-96.
152. Blume, S. W.; Snyder, R. C.; Ray, R.; Thomas, S.; Koller, C. A.; Miller, D. M., Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *J Clin Invest* **1991**, *88* (5), 1613-21.
153. Fuchs, J.; Rydzynski, J.; von Schweinitz, D.; Bode, U.; Hecker, H.; Weinel, P.; Burger, D.; Harms, D.; Erttmann, R.; Oldhafer, K.; Mildenerger, H., Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma: a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94. *Cancer* **2002**, *95* (1), 172-82.
154. Morris, L. G.; Kaufman, A. M.; Gong, Y.; Ramaswami, D.; Walsh, L. A.; Turcan, S.; Eng, S.; Kannan, K.; Zou, Y.; Peng, L.; Banuchi, V. E.; Paty, P.; Zeng, Z.; Vakiani, E.; Solit, D.; Singh, B.; Ganly, I.; Liao, L.; Cloughesy, T. C.; Mischel, P. S.; Mellinghoff, I. K.; Chan, T. A., Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation. *Nature genetics* **2013**, *45* (3), 253-61.
155. Marumoto, T.; Zhang, D.; Saya, H., Aurora-A - a guardian of poles. *Nature reviews. Cancer* **2005**, *5* (1), 42-50.
156. Bennett, G.; Papamichos-Chronakis, M.; Peterson, C. L., DNA repair choice defines a common pathway for recruitment of chromatin regulators. *Nature communications* **2013**, *4*, 2084.
157. Ui, A.; Chiba, N.; Yasui, A., Relationship among DNA double-strand break (DSB), DSB repair, and transcription prevents genome instability and cancer. *Cancer Sci* **2020**, *111* (5), 1443-1451.
158. Kulis, M.; Queiros, A. C.; Beekman, R.; Martin-Subero, J. I., Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1829* (11), 1161-74.
159. Sugawara, W.; Haruta, M.; Sasaki, F.; Watanabe, N.; Tsunematsu, Y.; Kikuta, A.; Kaneko, Y., Promoter hypermethylation of the RASSF1A gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. *Pediatric blood & cancer* **2007**, *49* (3), 240-9.

6 REFERENZEN

160. Bouras, E.; Karakioulaki, M.; Bougioukas, K. I.; Aivaliotis, M.; Tzimagiorgis, G.; Chourdakis, M., Gene promoter methylation and cancer: An umbrella review. *Gene* **2019**, *710*, 333-340.
161. Jung, Y.; Park, J.; Bang, Y. J.; Kim, T. Y., Gene silencing of TSPYL5 mediated by aberrant promoter methylation in gastric cancers. *Lab Invest* **2008**, *88* (2), 153-60.
162. Shen, J.; LeFave, C.; Sirosh, I.; Siegel, A. B.; Tycko, B.; Santella, R. M., Integrative epigenomic and genomic filtering for methylation markers in hepatocellular carcinomas. *BMC Med Genomics* **2015**, *8*, 28.
163. Shan, Z.; Shakoori, A.; Bodaghi, S.; Goldsmith, P.; Jin, J.; Wiest, J. S., TUSC1, a putative tumor suppressor gene, reduces tumor cell growth in vitro and tumor growth in vivo. *PLoS One* **2013**, *8* (6), e66114.
164. Kanda, M.; Shimizu, D.; Nomoto, S.; Hibino, S.; Oya, H.; Takami, H.; Kobayashi, D.; Yamada, S.; Inokawa, Y.; Tanaka, C.; Fujii, T.; Sugimoto, H.; Koike, M.; Fujiwara, M.; Kodera, Y., Clinical significance of expression and epigenetic profiling of TUSC1 in gastric cancer. *J Surg Oncol* **2014**, *110* (2), 136-44.
165. Shi, M.; Wang, S.; Yao, Y.; Li, Y.; Zhang, H.; Han, F.; Nie, H.; Su, J.; Wang, Z.; Yue, L.; Cao, J.; Li, Y., Biological and clinical significance of epigenetic silencing of MARVELD1 gene in lung cancer. *Scientific reports* **2014**, *4*, 7545.
166. Yu, Y.; Zhang, Y.; Hu, J.; Zhang, H.; Wang, S.; Han, F.; Yue, L.; Qu, Y.; Zhang, Y.; Liang, H.; Nie, H.; Li, Y., MARVELD1 inhibited cell proliferation and enhance chemosensitivity via increasing expression of p53 and p16 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* **2012**, *103* (4), 716-22.
167. Tan, H. W.; Leung, C. O.; Chan, K. K.; Ho, D. W.; Leung, M. S.; Wong, C. M.; Ng, I. O.; Lo, R. C., Deregulated GATA6 modulates stem cell-like properties and metabolic phenotype in hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer* **2019**, *145* (7), 1860-1873.
168. Ng, P. K. S.; Lau, C. P. Y.; Lam, E. K. Y.; Li, S. S. K.; Lui, V. W. Y.; Yeo, W.; Ng, Y. K.; Lai, P. B. S.; Tsui, S. K. W., Hypermethylation of NF-kappaB-Activating Protein-Like (NKAPL) Promoter in Hepatocellular Carcinoma Suppresses Its Expression and Predicts a Poor Prognosis. *Dig Dis Sci* **2018**, *63* (3), 676-686.
169. Weissbein, U.; Plotnik, O.; Vershkov, D.; Benvenisty, N., Culture-induced recurrent epigenetic aberrations in human pluripotent stem cells. *PLoS genetics* **2017**, *13* (8), e1006979.
170. Tocchini, C.; Ciosk, R., TRIM-NHL proteins in development and disease. *Semin Cell Dev Biol* **2015**, *47-48*, 52-9.
171. Loedige, I.; Gaidatzis, D.; Sack, R.; Meister, G.; Filipowicz, W., The mammalian TRIM-NHL protein TRIM71/LIN-41 is a repressor of mRNA function. *Nucleic acids research* **2013**, *41* (1), 518-32.
172. Kwon, S. C.; Yi, H.; Eichelbaum, K.; Fohr, S.; Fischer, B.; You, K. T.; Castello, A.; Krijgsveld, J.; Hentze, M. W.; Kim, V. N., The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* **2013**, *20* (9), 1122-30.
173. Chen, Y. L.; Yuan, R. H.; Yang, W. C.; Hsu, H. C.; Jeng, Y. M., The stem cell E3-ligase Lin-41 promotes liver cancer progression through inhibition of microRNA-mediated gene silencing. *J Pathol* **2013**, *229* (3), 486-96.
174. De Cecco, L.; Negri, T.; Brich, S.; Mauro, V.; Bozzi, F.; Dagrada, G.; Disciglio, V.; Sanfilippo, R.; Gronchi, A.; D'Incalci, M.; Casali, P. G.; Canevari, S.; Pierotti, M. A.; Pilotti, S., Identification of a gene expression driven progression pathway in myxoid liposarcoma. *Oncotarget* **2014**, *5* (15), 5965-77.
175. Chang, H. M.; Martinez, N. J.; Thornton, J. E.; Hagan, J. P.; Nguyen, K. D.; Gregory, R. I., Trim71 cooperates with microRNAs to repress Cdkn1a expression and promote embryonic stem cell proliferation. *Nature communications* **2012**, *3*, 923.
176. Becker, K. A.; Ghule, P. N.; Therrien, J. A.; Lian, J. B.; Stein, J. L.; van Wijnen, A. J.; Stein, G. S., Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol* **2006**, *209* (3), 883-93.
177. Worringer, K. A.; Rand, T. A.; Hayashi, Y.; Sami, S.; Takahashi, K.; Tanabe, K.; Narita, M.; Srivastava, D.; Yamanaka, S., The let-7/LIN-41 pathway regulates reprogramming to human induced pluripotent stem cells by controlling expression of prodifferentiation genes. *Cell stem cell* **2014**, *14* (1), 40-52.
178. Lee, Y. S.; Dutta, A., The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* **2007**, *21* (9), 1025-30.
179. Lin, Y. C.; Hsieh, L. C.; Kuo, M. W.; Yu, J.; Kuo, H. H.; Lo, W. L.; Lin, R. J.; Yu, A. L.; Li, W. H., Human TRIM71 and its nematode homologue are targets of let-7 microRNA and its zebrafish orthologue is essential for development. *Mol Biol Evol* **2007**, *24* (11), 2525-34.
180. Guo, Y.; Chen, Y.; Ito, H.; Watanabe, A.; Ge, X.; Kodama, T.; Aburatani, H., Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene* **2006**, *384*, 51-61.
181. Bloch, E. M.; Busch, M. P.; Lee, T. H.; Montalvo, L.; Matthews, Y.; Bird, A.; Bruhn, R.; Stefan, V., Microchimerism in the transfused obstetric population. *Vox Sang* **2014**, *107* (4), 428-30.
182. Boyerinas, B.; Park, S. M.; Shomron, N.; Hedegaard, M. M.; Vinther, J.; Andersen, J. S.; Feig, C.; Xu, J.; Burge, C. B.; Peter, M. E., Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer research* **2008**, *68* (8), 2587-91.
183. Zhao, X. P.; Zhang, H.; Jiao, J. Y.; Tang, D. X.; Wu, Y. L.; Pan, C. B., Overexpression of HMGA2 promotes tongue cancer metastasis through EMT pathway. *J Transl Med* **2016**, *14*, 26.
184. Wang, Y.; Li, J.; Guo, S.; Ouyang, Y.; Yin, L.; Liu, S.; Zhao, Z.; Yang, J.; Huang, W.; Qin, H.; Zhao, X.; Ni, B.; Wang, H., Lin28B facilitates the progression and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* **2017**, *8* (36), 60414-60428.
185. Rybak, A.; Fuchs, H.; Smirnova, L.; Brandt, C.; Pohl, E. E.; Nitsch, R.; Wulczyn, F. G., A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol* **2008**, *10* (8), 987-93.

6 REFERENZEN

186. Stohr, N.; Kohn, M.; Lederer, M.; Glass, M.; Reinke, C.; Singer, R. H.; Huttelmaier, S., IGF2BP1 promotes cell migration by regulating MK5 and PTEN signaling. *Genes Dev* **2012**, *26* (2), 176-89.
187. Yin, J.; Kim, T. H.; Park, N.; Shin, D.; Choi, H. I.; Cho, S.; Park, J. B.; Kim, J. H., TRIM71 suppresses tumorigenesis via modulation of Lin28B-let-7-HMGA2 signaling. *Oncotarget* **2016**, *7* (48), 79854-79868.
188. Kawakami, Y.; Esteban, C. R.; Matsui, T.; Rodriguez-Leon, J.; Kato, S.; Izpisua Belmonte, J. C., Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos. *Development* **2004**, *131* (19), 4763-74.
189. Safe, S.; Abbruzzese, J.; Abdelrahim, M.; Hedrick, E., Specificity Protein Transcription Factors and Cancer: Opportunities for Drug Development. *Cancer Prev Res (Phila)* **2018**, *11* (7), 371-382.
190. Beishline, K.; Azizkhan-Clifford, J., Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *The FEBS journal* **2015**, *282* (2), 224-58.
191. Tao, G.; Li, Z.; Wen, Y.; Song, X.; Wei, S.; Du, H.; Yang, Z.; Xu, Z.; You, Y., Transcription Factors Sp8 and Sp9 Regulate Medial Ganglionic Eminence-Derived Cortical Interneuron Migration. *Front Mol Neurosci* **2019**, *12*, 75.
192. Marsh, S. K.; Bansal, G. S.; Zammit, C.; Barnard, R.; Coope, R.; Roberts-Clarke, D.; Gomm, J. J.; Coombes, R. C.; Johnston, C. L., Increased expression of fibroblast growth factor 8 in human breast cancer. *Oncogene* **1999**, *18* (4), 1053-60.
193. Liu, R.; Huang, S.; Lei, Y.; Zhang, T.; Wang, K.; Liu, B.; Nice, E. C.; Xiang, R.; Xie, K.; Li, J.; Huang, C., FGF8 promotes colorectal cancer growth and metastasis by activating YAP1. *Oncotarget* **2015**, *6* (2), 935-52.
194. Valta, M. P.; Tuomela, J.; Bjartell, A.; Valve, E.; Vaananen, H. K.; Harkonen, P., FGF-8 is involved in bone metastasis of prostate cancer. *International journal of cancer* **2008**, *123* (1), 22-31.
195. Gauglhofer, C.; Sagmeister, S.; Schrottmaier, W.; Fischer, C.; Rodgarkia-Dara, C.; Mohr, T.; Stattner, S.; Bichler, C.; Kandioler, D.; Wrba, F.; Schulte-Hermann, R.; Holzmann, K.; Grusch, M.; Marian, B.; Berger, W.; Grasl-Kraupp, B., Up-regulation of the fibroblast growth factor 8 subfamily in human hepatocellular carcinoma for cell survival and neoangiogenesis. *Hepatology* **2011**, *53* (3), 854-64.
196. Dorkin, T. J.; Robinson, M. C.; Marsh, C.; Bjartell, A.; Neal, D. E.; Leung, H. Y., FGF8 over-expression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease. *Oncogene* **1999**, *18* (17), 2755-61.
197. Ruohola, J. K.; Viitanen, T. P.; Valve, E. M.; Seppanen, J. A.; Loponen, N. T.; Keskitalo, J. J.; Lakkakorpi, P. T.; Harkonen, P. L., Enhanced invasion and tumor growth of fibroblast growth factor 8b-overexpressing MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer research* **2001**, *61* (10), 4229-37.
198. Shimada, N.; Ishii, T.; Imada, T.; Takaba, K.; Sasaki, Y.; Maruyama-Takahashi, K.; Maekawa-Tokuda, Y.; Kusaka, H.; Akinaga, S.; Tanaka, A.; Shitara, K., A neutralizing anti-fibroblast growth factor 8 monoclonal antibody shows potent antitumor activity against androgen-dependent mouse mammary tumors in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2005**, *11* (10), 3897-904.
199. Huang, C. C.; Cheng, S. H.; Wu, C. H.; Li, W. Y.; Wang, J. S.; Kung, M. L.; Chu, T. H.; Huang, S. T.; Feng, C. T.; Huang, S. C.; Tai, M. H., Delta-like 1 homologue promotes tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition of ovarian high-grade serous carcinoma through activation of Notch signaling. *Oncogene* **2019**, *38* (17), 3201-3215.
200. Malek, A.; Nunez, L. E.; Magistri, M.; Brambilla, L.; Jovic, S.; Carbone, G. M.; Moris, F.; Catapano, C. V., Modulation of the activity of Sp transcription factors by mithramycin analogues as a new strategy for treatment of metastatic prostate cancer. *PLoS One* **2012**, *7* (4), e35130.
201. Saha, S.; Mukherjee, S.; Mazumdar, M.; Manna, A.; Khan, P.; Adhikary, A.; Kajal, K.; Jana, D.; Sa, G.; Mukherjee, S.; Sarkar, D. K.; Das, T., Mithramycin A sensitizes therapy-resistant breast cancer stem cells toward genotoxic drug doxorubicin. *Transl Res* **2015**, *165* (5), 558-77.
202. Quarni, W.; Dutta, R.; Green, R.; Katiri, S.; Patel, B.; Mohapatra, S. S.; Mohapatra, S., Mithramycin A Inhibits Colorectal Cancer Growth by Targeting Cancer Stem Cells. *Scientific reports* **2019**, *9* (1), 15202.
203. Li, J.; Gao, H.; Meng, L.; Yin, L., Mithramycin inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and invasion by downregulating SP1 and SNAI1 in salivary adenoid cystic carcinoma. *Tumour Biol* **2017**, *39* (6), 1010428317708697.
204. Grohar, P. J.; Glod, J.; Peer, C. J.; Sissung, T. M.; Arnaldez, F. I.; Long, L.; Figg, W. D.; Whitcomb, P.; Helman, L. J.; Widemann, B. C., A phase I/II trial and pharmacokinetic study of mithramycin in children and adults with refractory Ewing sarcoma and EWS-FLI1 fusion transcript. *Cancer Chemother Pharmacol* **2017**, *80* (3), 645-652.
205. Mendez, C.; Gonzalez-Sabin, J.; Moris, F.; Salas, J. A., Expanding the Chemical Diversity of the Antitumoral Compound Mithramycin by Combinatorial Biosynthesis and Biocatalysis: The Quest for Mithralogs with Improved Therapeutic Window. *Planta Med* **2015**, *81* (15), 1326-38.
206. Zhang, B.; Pan, X.; Cobb, G. P.; Anderson, T. A., microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* **2007**, *302* (1), 1-12.
207. Kong, Y. W.; Ferland-McCollough, D.; Jackson, T. J.; Bushell, M., microRNAs in cancer management. *The Lancet. Oncology* **2012**, *13* (6), e249-58.
208. von Frowein, J.; Hauck, S. M.; Kappler, R.; Pagel, P.; Fleischmann, K. K.; Magg, T.; Cairo, S.; Roscher, A.; von Schweinitz, D.; Schmid, I., MiR-492 regulates metastatic properties of hepatoblastoma via CD44. *Liver Int* **2018**, *38* (7), 1280-1291.
209. Indersie, E.; Lesjean, S.; Hooks, K. B.; Sagliocco, F.; Ernault, T.; Cairo, S.; Merched-Sauvage, M.; Rullier, A.; Le Bail, B.; Taque, S.; Grotzer, M.; Branchereau, S.; Guettier, C.; Fabre, M.; Brugieres, L.; Hagedorn, M.; Buendia, M. A.; Grosset, C. F., MicroRNA therapy inhibits hepatoblastoma growth in vivo by targeting beta-catenin and Wnt signaling. *Hepatal Commun* **2017**, *1* (2), 168-183.

6 REFERENZEN

210. Zhang, Y.; Zhao, Y.; Wu, J.; Liangpunsakul, S.; Niu, J.; Wang, L., MicroRNA-26-5p functions as a new inhibitor of hepatoblastoma by repressing lin-28 homolog B and aurora kinase a expression. *Hepatol Commun* **2018**, *2* (7), 861-871.
211. Zhou, A. D.; Diao, L. T.; Xu, H.; Xiao, Z. D.; Li, J. H.; Zhou, H.; Qu, L. H., beta-Catenin/LEF1 transactivates the microRNA-371-373 cluster that modulates the Wnt/beta-catenin-signaling pathway. *Oncogene* **2012**, *31* (24), 2968-78.
212. Lee, H.; Han, S.; Kwon, C. S.; Lee, D., Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell* **2016**, *7* (2), 100-13.
213. Yang, J. S.; Phillips, M. D.; Betel, D.; Mu, P.; Ventura, A.; Siepel, A. C.; Chen, K. C.; Lai, E. C., Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA* **2011**, *17* (2), 312-26.
214. Gailhouse, L.; Liew, L. C.; Yasukawa, K.; Hatada, I.; Tanaka, Y.; Kato, T.; Nakagama, H.; Ochiya, T., MEG3-derived miR-493-5p overcomes the oncogenic feature of IGF2-miR-483 loss of imprinting in hepatic cancer cells. *Cell death & disease* **2019**, *10* (8), 553.
215. Tang, S.; Chen, Y.; Feng, S.; Yi, T.; Liu, X.; Li, Q.; Liu, Z.; Zhu, C.; Hu, J.; Yu, X.; Wang, M.; Cao, G.; Tang, H.; Bie, C.; Ma, F.; Tang, H.; Du, G.; Huang, J., MiR-483-5p promotes IGF-II transcription and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **2017**, *8* (59), 99871-99888.
216. Vasuri, F.; Fittipaldi, S.; De Pace, V.; Gramantieri, L.; Bertuzzo, V.; Cescon, M.; Pinna, A. D.; Fiorentino, M.; D'Errico, A.; Ravaioli, M., Tissue miRNA 483-3p expression predicts tumor recurrence after surgical resection in histologically advanced hepatocellular carcinomas. *Oncotarget* **2018**, *9* (25), 17895-17905.
217. Swier, L.; Dzikiewicz-Krawczyk, A.; Winkle, M.; van den Berg, A.; Kluiver, J., Intricate crosstalk between MYC and non-coding RNAs regulates hallmarks of cancer. *Mol Oncol* **2019**, *13* (1), 26-45.
218. Rand, T. A.; Sutou, K.; Tanabe, K.; Jeong, D.; Nomura, M.; Kitaoka, F.; Tomoda, E.; Narita, M.; Nakamura, M.; Nakamura, M.; Watanabe, A.; Rulifson, E.; Yamanaka, S.; Takahashi, K., MYC Releases Early Reprogrammed Human Cells from Proliferation Pause via Retinoblastoma Protein Inhibition. *Cell Rep* **2018**, *23* (2), 361-375.
219. Copley, M. R.; Babovic, S.; Benz, C.; Knapp, D. J.; Beer, P. A.; Kent, D. G.; Wohrer, S.; Treloar, D. Q.; Day, C.; Rowe, K.; Mader, H.; Kuchenbauer, F.; Humphries, R. K.; Eaves, C. J., The Lin28b-let-7-Hmga2 axis determines the higher self-renewal potential of fetal haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* **2013**, *15* (8), 916-25.
220. Huang, X.; Zhang, H.; Guo, X.; Zhu, Z.; Cai, H.; Kong, X., Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) in cancer. *J Hematol Oncol* **2018**, *11* (1), 88.
221. Bell, J. L.; Wachter, K.; Muhleck, B.; Pazaitis, N.; Kohn, M.; Lederer, M.; Huttelmaier, S., Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci* **2013**, *70* (15), 2657-75.
222. Wang, L.; Rowe, R. G.; Jaimes, A.; Yu, C.; Nam, Y.; Pearson, D. S.; Zhang, J.; Xie, X.; Marion, W.; Heffron, G. J.; Daley, G. Q.; Sliz, P., Small-Molecule Inhibitors Disrupt let-7 Oligouridylation and Release the Selective Blockade of let-7 Processing by LIN28. *Cell Rep* **2018**, *23* (10), 3091-3101.
223. Hao, J.; Zhang, S.; Zhou, Y.; Hu, X.; Shao, C., MicroRNA 483-3p suppresses the expression of DPC4/Smad4 in pancreatic cancer. *FEBS Lett* **2011**, *585* (1), 207-13.
224. Yong, F. L.; Law, C. W.; Wang, C. W., Potentiality of a triple microRNA classifier: miR-193a-3p, miR-23a and miR-338-5p for early detection of colorectal cancer. *BMC cancer* **2013**, *13*, 280.
225. Shen, J.; Wang, A.; Wang, Q.; Gurvich, I.; Siegel, A. B.; Remotti, H.; Santella, R. M., Exploration of genome-wide circulating microRNA in hepatocellular carcinoma: MiR-483-5p as a potential biomarker. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **2013**, *22* (12), 2364-73.
226. Itoh, N.; Nakayama, Y.; Konishi, M., Roles of FGFs As Paracrine or Endocrine Signals in Liver Development, Health, and Disease. *Frontiers in cell and developmental biology* **2016**, *4*, 30.
227. Sekhon, S. S.; Tan, X.; Micsenyi, A.; Bowen, W. C.; Monga, S. P., Fibroblast growth factor enriches the embryonic liver cultures for hepatic progenitors. *The American journal of pathology* **2004**, *164* (6), 2229-40.

7 VERZEICHNISSE

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AFP	Alpha-Fetoprotein
AGO1/2	<i>Argonate RISC Component 1/2</i>
ALCAM	<i>Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule</i>
ALDH2	<i>Aldehyde Dehydrogenase 2 Family Member</i>
APC	<i>APC Regulator of WNT Signaling Pathway</i>
APCS	<i>Amyloid P Component, Serum</i>
APOC4	<i>Apolipoprotein C4</i>
AQP9	<i>Aquaporin 9</i>
AXIN1/2	<i>Axin 1/2</i>
BS	Bindestelle
BSA	Bovines Serumalbumin
BUB1	<i>BUB1 Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase</i>
C1S	<i>Complement C1s</i>
Ca.	circa
CASP8	Caspase 8
CAV2	Caveolin 2
CC	<i>Coiled coiled</i>
CCND1	Cyclin D1
CDH1	E-Cadherin
CDKN1A/B	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A/B</i>
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIMP	<i>CpG-Island methylator phenotype</i>
CMV	Zytomegalievirus
CNV	<i>Copy number variation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COG	<i>Children's Oncology Group</i>
CTCF	<i>CCCTC-Binding Factor</i>
CTNNB1	Catenin Beta 1
CYP2E1	<i>Cytochrome P450 Family 2 Subfamily E Member 1</i>
D	Deutschland
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
dCas9	Deaktivierte Cas9
DIO3	<i>Iodothyronine Deiodinase 3</i>
DKK1	<i>Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1</i>
DLG7	<i>DLG Associated Protein 5</i>
DLK1	<i>Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMR	Differentiell methylierte Region
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT1	DNA Methyltransferase 1
DNMT3a	DNA Methyltransferase 3 Alpha
DNMT3b	DNA Methyltransferase 3 Beta

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholsäure
DOK2	<i>Docking Protein 2</i>
DTT	Dithiothreitol
DUSP9	<i>Dual Specificity Phosphatase 9</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
E2F5	<i>E2F Transcription Factor 5</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGR1	<i>Early Growth Response 1</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EPCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i>
FAT1	<i>FAT Atypical Cadherin 1</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FGF8	<i>Fibroblast Growth Factor 8</i>
flHCC	Fibrolamelläres HCC
fw	<i>forward</i>
g	Gravitationskraft
G1/2	Gruppe 1/2
GATA4/6	<i>GATA Binding Protein 4/6</i>
GHR	<i>Growth Hormone Receptor</i>
GLI1	<i>GLI Family Zinc Finger 1</i>
GPC3	<i>Glypican 3</i>
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
gRNA	guideRNA
h	Stunde
H19	<i>H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript</i>
H ₂ O	Wasser
H3K4me3	Dreifachmethylierung von Lysin 4 am Histon H3
HB	Hepatoblastom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HHIP	<i>Hedgehog Interacting Protein</i>
HMGA2	<i>High Mobility Group AT-Hook 2</i>
HPD	<i>4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSD17B6	<i>Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 6</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFITM1	<i>Interferon Induced Transmembrane Protein 1</i>
IGF2	<i>Insulin Like Growth Factor 2</i>
IGF2BP1/3	<i>Insulin Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 1/3</i>
IGFBP3	<i>Insulin Like Growth Factor Binding Protein 3</i>
IGSF1	<i>Immunoglobulin Superfamily Member 1</i>
ITGA6	<i>Integrin Subunit Alpha 6</i>
JPLT	<i>Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor</i>
KEAP1	<i>Kelch Like ECH Associated Protein 1</i>
KLF4/6	<i>Krüppel Like Factor 4/6</i>
KRAB	<i>Krüppel associated box</i>
KRAS	<i>KRAS Proto-Oncogene, GTPase</i>
KREMEN2	<i>Kringle Containing Transmembrane Protein 2</i>

KRT19	Keratin 19
LAPTM5	<i>Lysosomal Protein Transmembrane 5</i>
LB	Luria-Bertani
LDB1	<i>LIM Domain Binding 1</i>
LGR5	<i>Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5</i>
LiCl	Lithiumchlorid
LIMA1	<i>LIM Domain And Actin Binding 1</i>
LIN28A/B	<i>Lin-28 Homolog A/B</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
LXN	<i>Latexin</i>
MARVELD1	<i>MARVEL Domain Containing 1</i>
MCC	<i>Mutated in colorectal cancer</i>
min	Minute
miR	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMA	Mythramycin A
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRT	Maligne Rhabdoidtumore der Leber
MT1G	<i>Metallothionein 1G</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid</i>
MVG	<i>Most variable genes</i>
MYC	<i>MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor</i>
MYCN	<i>MYCN Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor</i>
NANOG	<i>Nanog Homeobox</i>
NFE2L2	<i>Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
ng	Nanogramm
NHL	<i>NCL-1/HT2A/LIN-41</i>
NKAPL	<i>NFKB Activating Protein Like</i>
NKD1	<i>NKD Inhibitor Of WNT Signaling Pathway 1</i>
NL	Normalleber
NLE1	<i>Notchless Homolog 1</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NOTUM	<i>Notum, Palmitoleoyl-Protein Carboxylesterase</i>
NQO1	<i>NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1</i>
NR2F2	<i>Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2</i>
OLIG3	<i>Oligodendrocyte Transcription Factor 3</i>
ONECUT1/2	<i>One Cut Homeobox 1/2</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate buffered saline mit Tween 20</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Parafomaldehyd
PIPES	piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
PLT	Pädiatrische Lebertumore
PRETEXT	<i>Pretreatment extend of disease</i>
PROX1	<i>Prospero Homeobox 1</i>
PS	Penicillin-Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q-PCR	Quantitative PCR
RASSF1/5	<i>Ras Association Domain Family Member 1/5</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>

RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPL10A	<i>Ribosomal Protein L10a</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RUNX1	<i>RUNX Family Transcription Factor 1</i>
rv	<i>reverse</i>
sec	Sekunden
SALL4	<i>Spalt Like Transcription Factor 4</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SEMA5A	<i>Semaphorin 5A</i>
sfGFP	<i>Superfolder green fluorescence protein</i>
SFRP1	<i>Secreted Frizzled Related Protein 1</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog Signaling Molecule</i>
siNTC	Ungerichtete siRNA
SIOPEL	<i>International Childhood Liver Tumours Strategy Group</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
siSP8	siRNA gegen die SP8-mRNA
siTRIM71	siRNA gegen die TRIM71-mRNA
SOCS1/3	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 1/3</i>
SOX2	<i>SRY-Box Transcription Factor 2</i>
SP1-8	<i>Sp1-8 Transcription Factor</i>
SPINT2	<i>Serine Peptidase Inhibitor, Kunitz Type 2</i>
SPP1	<i>Secreted Phosphoprotein 1</i>
T	<i>Brachyury</i>
TBP	<i>TATA-Box Binding Protein</i>
TBX3	<i>T-Box Transcription Factor 3</i>
TERT	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TOM	<i>Topological Overlap Matrix</i>
TOP2A	DNA Topoisomerase II Alpha
TRANK1	<i>Tetratricopeptide Repeat And Ankyrin Repeat Containing 1</i>
TRIM71	<i>Tripartite Motif Containing 71</i>
t-SNE	<i>t-distributed stochastic neighbour embedding</i>
TSPYL5	<i>TSPY Like 5</i>
TSS	Transkriptionsstartstelle
TUSC1	<i>Tumor Suppressor Candidate 1</i>
TWIST1	<i>Twist Family BHLH Transcription Factor 1</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
VIM	Vimentin
WB	Western Blot
WGCNA	<i>Weighted correlation network analysis</i>
XAF1	<i>XIAP Associated Factor 1</i>
ZEB1	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>
ZL	Zelllinie

7.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: TUMOR-STADIENBESTIMMUNG NACH PRETEXT.	5
ABBILDUNG 2: DIE INVASIONS-METASTASIERUNGSKASKADE.	7
ABBILDUNG 3: GLOBALE METHYLIERUNGSMUSTER PÄDIATRISCHER LEBERTUMORE.	38
ABBILDUNG 4: GLOBALE METHYLIERUNGSMUSTER PÄDIATRISCHER LEBERTUMORE.	38
ABBILDUNG 5: MITTLERE GLOBALE METHYLIERUNGSWERTE AN GENSPEZIFISCHEN BEREICHEN.....	39
ABBILDUNG 6: KOPIENZAHLVERÄNDERUNG VON G1- UND G2-TUMOREN	40
ABBILDUNG 7: KLINISCHE EVALUATION DES EPIGENETISCHEN FUßABDRUCKES KINDLICHER LEBERTUMORE.....	42
ABBILDUNG 8: GLOBALES EXPRESSIONSPROFIL VON HBS.	43
ABBILDUNG 9: ANALYSE DER TRANSKRIPTOMDATEN.....	44
ABBILDUNG 10: FUNKTIONELLE ANNOTATION DER TRANSKRIPTOMDATEN	45
ABBILDUNG 11: INTEGRATION DER METHYLOM- UND TRANSKRIPTOM-DATEN.....	46
ABBILDUNG 12: KORRELATION DER CPG-INSEL-METHYLIERUNG UND MRNA-EXPRESSION VON TUMORSUPPRESSORGENEN.....	46
ABBILDUNG 13: METHYLIERUNG UND EXPRESSION VON <i>TRIM71</i>	47
ABBILDUNG 14: KOEXPRESSIONSMATRIX VON <i>TRIM71</i>	48
ABBILDUNG 15: UNTERSUCHUNG KOEXPRIMIERTER GENE VON <i>TRIM71</i>	49
ABBILDUNG 16: <i>GAIN</i> - UND <i>LOSS-OF-FUNCTION</i> -STUDIEN MIT <i>TRIM71</i>	50
ABBILDUNG 17: WNT-SIGNALWEGSAKTIVIERUNG NACH <i>TRIM71</i> -MODULATION	52
ABBILDUNG 18: EXPRESSIONSANALYSE DER VIER-MIR-SIGNATUR IM HB.....	53
ABBILDUNG 19: EXPRESSIONSANALYSE VON MIR-483-3P UND MIR-483-5P IM HB.....	54
ABBILDUNG 20: GLOBALE TRANSKRIPTOM- UND METHYLOM-ANALYSE IN METASTASIIERTEN UND NICHT-METASTASIIERTEN HBS	57
ABBILDUNG 21: DIE EXPRESSION VON <i>SP8</i> UND <i>FGF8</i> UND IHRE KLINISCHEN ASSOZIATIONEN	58
ABBILDUNG 22: ANALYSE DER TUMOREIGENSCHAFTEN VON <i>SP8</i> -INDUZIERTEN HEP3B-POOL- ZELLEN.....	59
ABBILDUNG 23: <i>SP8</i> UND DIE EPITHELIALE-MESENCHYMIALE TRANSITION.....	61
ABBILDUNG 24: <i>SP8</i> -INTERAKTION MIT DEM <i>FGF8</i> -PROMOTOR	62
ABBILDUNG 25: <i>RESCUE</i> -EXPERIMENTE MITTELS <i>CRISPR INTERFERENCE</i> -VERMITTELTEN <i>FGF8</i> - KNOCK-DOWN	63
ABBILDUNG 26: EVALUIERUNG DER <i>SP8</i> -MODULATION IN HEPATOMZELLINIEN	64
ABBILDUNG 27: <i>GAIN</i> - UND <i>LOSS-OF-FUNCTION</i> -EXPERIMENTE MIT <i>SP8</i> IN HEPATOMZELLINIEN .	66
ABBILDUNG 28: ANWENDUNG VON MITHRAMYCIN A AUF HEPATOBLASTOMZELLINIEN	67
ABBILDUNG 29: MITTLERE GLOBALE METHYLIERUNGSWERTE WEITERER EPIGENETISCHER STRUKTUREN.....	96
ABBILDUNG 30: PYROSEQUENZIER-ERGEBNISSE AM <i>TRIM71</i> -LOKUS.....	99
ABBILDUNG 31: ZUSÄTZLICHE EXPRESSIONSDATEN.	100
ABBILDUNG 32: ETABLIERUNG UND OPTIMIERUNG VON <i>CRISPR INTERFERENCE</i>	101

7.3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PRIMER UND OLIGOS	17
TABELLE 2: ZUSAMMENSETZUNG DES PCR-REAKTIONSMIXES	27
TABELLE 3: ZYKLUSPROGRAMM DER PCR	27
TABELLE 4: BESTANDTEILE DES RESTRIKTIONSVERDAUS.....	27
TABELLE 5: REAKTIONSBEDINGUNGEN DER RESTRIKTIONSENZYME	28
TABELLE 6: REAKTIONSMIX DER DNA-LIGATION.....	28
TABELLE 7: REAKTIONSMIX DER Q-PCR.....	32
TABELLE 8: ZYKLUSPROGRAMM DER Q-PCR	32
TABELLE 9: PROMOTORMETHYLIERUNG VON TUMORSUPPRESSORGENEN IN G2	96
TABELLE 10: DIFFERENTIELL METHYLIERTE REGIONEN ZWISCHEN G2 UND G1.....	97
TABELLE 11: ASSOZIATION KLINISCHER PARAMETER MIT G1- UND G2-HCCs	99

8 ANHANG

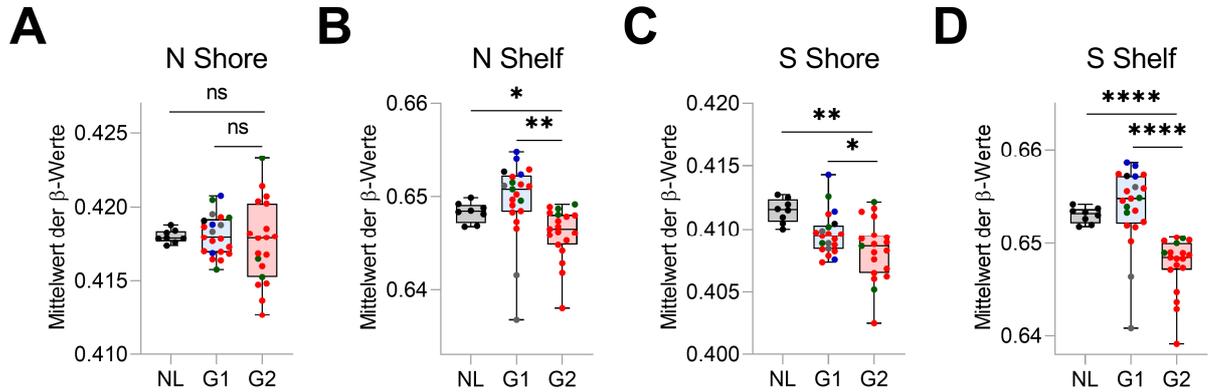


Abbildung 29: Boxplot-Darstellung der gemittelten β -Werte von (A) N Shore klassifizierten CpGs, (B) N Shelf klassifizierten CpGs, (C) S Shore klassifizierten CpGs und (D) S Shelf klassifizierten CpGs kategorisiert nach den epigenetischen Clustern NL, G1 und G2. NL: schwarze Punkte, HB: rote Punkte, HCC: grüne Punkte, fHCC: blaue Punkte, MRT: graue Punkte.

Tabelle 9: Promotormethylierung von Tumorsuppressorgenen in G2

CpG	Gen	Mittelwert NL	Mittelwert G1	Mittelwert G2	Δ G2 zu G1	Änderung in %	Fold Change Methylation	Fold Change Methylation [log2]	Fold Change Gen-expression [log2]
cg01951274	MIR142	0.6010128	0.5572022	0.70722574	0.15002353	26.924433	1.26924433	0.34396982	-3.71957031
cg26112797		0.7506614	0.67606033	0.82428002	0.14821969	21.9240329	1.21924033	0.28598253	-3.71957031
cg10530767		0.67346063	0.61868886	0.7656832	0.14699434	23.7590093	1.23759009	0.30753355	-3.71957031
cg00178888		0.58529201	0.51523345	0.63547775	0.1202443	23.3378283	1.23337828	0.30261535	-3.71957031
cg15681358		0.29748402	0.14613293	0.33445925	0.18832633	128.873305	2.28873305	1.1945492	-2.23008967
cg06632214	MARVELD1	0.39341898	0.33603992	0.70682278	0.37078286	110.338992	2.10338992	1.07271591	-1.8278012
cg10552523		0.37979158	0.36378543	0.66424775	0.30046233	82.5932829	1.82593283	0.86683369	-1.8278012
cg14967066		0.26191893	0.27557731	0.56521317	0.28963586	105.101491	2.05110149	1.03633798	-1.8278012
cg21625464		0.10778945	0.16236125	0.44384347	0.28148221	173.367851	2.73367851	1.45084359	-1.8278012
cg20566897		0.42740287	0.45980689	0.72562892	0.26582203	57.8116673	1.57811667	0.65820387	-1.8278012
cg11694510	IFITM1	0.47420178	0.487661	0.67129818	0.18363718	37.6567298	1.3765673	0.46107514	-1.8278012
cg04911005		0.22287197	0.20639005	0.53403933	0.32764929	158.752463	2.58752463	1.37157259	-1.77380799
cg07654934		0.19073732	0.1778696	0.48621722	0.30834762	173.355996	2.73355996	1.45078102	-1.77380799
cg25727025		0.21880933	0.21101127	0.50303069	0.29201942	138.390441	2.38390441	1.25332639	-1.77380799
cg12896421		0.15801323	0.16464655	0.43432331	0.26967677	163.791328	2.63791328	1.39939714	-1.77380799
cg22210627	LXN	0.27756838	0.29883172	0.55965168	0.26081996	87.2798795	1.8727988	0.90519591	-1.77380799
cg27533704		0.21668416	0.18518855	0.44025905	0.2550705	137.735569	2.37735569	1.24935777	-1.77380799
cg08538682		0.12644396	0.12801163	0.34931479	0.22130315	172.877376	2.72877376	1.44825729	-1.77380799
cg17977250		0.3404323	0.35783549	0.5627993	0.20496381	57.2787808	1.57278781	0.65332404	-1.77380799
cg08263647		0.39846944	0.42915799	0.59775182	0.16859384	39.2847949	1.39284795	0.63803777	-1.77380799
cg17481912	NKAPL	0.41644293	0.40575437	0.57313102	0.16737666	41.2507342	1.41250734	0.49825837	-1.77380799
cg10253847		0.14201005	0.22519261	0.48205074	0.25685813	114.061524	2.14061524	1.09802551	-1.72131499
cg01031101		0.29919695	0.36384784	0.61667895	0.25283111	69.4881455	1.69488146	0.76118437	-1.72131499
cg18694169		0.28637624	0.32641063	0.57149647	0.24508584	75.0851263	1.75085126	0.80805653	-1.72131499
cg09523275		0.22494546	0.2881483	0.52932863	0.24118032	83.7000663	1.83700066	0.87735215	-1.72131499
cg18675097	KLF6	0.32984734	0.41644014	0.65243433	0.23599418	56.6694121	1.56669412	0.64772354	-1.72131499
cg17384889		0.29699028	0.34791716	0.57483224	0.22686048	65.1950834	1.65195083	0.72417075	-1.72131499
cg00765128		0.32658185	0.33267416	0.51861234	0.18593819	55.8919838	1.55891984	0.64054674	-1.72131499
cg12510118		0.38878223	0.39935816	0.54935764	0.14999948	37.5601399	1.3756014	0.46006249	-1.72131499
cg10055566		0.28754877	0.34133843	0.47296575	0.13162732	38.5621169	1.38562117	0.47053288	-1.72131499
cg13454226	KLF6	0.32139801	0.17681103	0.49350445	0.31669342	179.114067	2.79114067	1.48085484	-1.66911846
cg23680451		0.52584497	0.31846241	0.59591855	0.27745614	87.1236728	1.87123673	0.90399208	-1.66911846
cg06048750		0.49843273	0.34682376	0.57903499	0.23221123	66.9536696	1.6695367	0.7394478	-1.66911846
cg24003508		0.13480292	0.14966616	0.34943278	0.19976662	133.474807	2.33474807	1.22326688	-1.66911846
cg25749254		0.51901342	0.34872853	0.52079596	0.17206743	49.3413667	1.49341367	0.57861384	-1.66911846
cg11847468	DOK2	0.26364392	0.10990076	0.2599132	0.15001243	136.498082	2.36498082	1.24182848	-1.66911846
cg24287110		0.09617444	0.13366552	0.24983	0.11616448	86.9068426	1.86906843	0.90231939	-1.66911846
cg09314421		0.516767	0.38781357	0.53378564	0.14597207	37.6397545	1.37639755	0.46089722	-1.33763586
cg14386061		0.69697209	0.62419532	0.74686318	0.12266787	19.6521605	1.1965216	0.25884645	-1.33763586
cg21031128		0.65810722	0.54998771	0.65996885	0.10998113	19.9970164	1.19997016	0.26299854	-1.33763586
cg13292636	LIMA1	0.56774978	0.4644948	0.57080592	0.10631112	22.887473	1.22887473	0.29733786	-1.33763586
cg23497020		0.54758998	0.3010758	0.61629596	0.31522016	104.69794	2.0469794	1.03349659	-1.18387383
cg12892471		0.56659477	0.45078427	0.70746729	0.25668301	56.9414307	1.56941431	0.65022626	-1.18387383
cg06817772		0.65935671	0.57489911	0.71277571	0.13787661	23.9827487	1.23982749	0.31013939	-1.18387383
cg19919590		0.48978836	0.37379357	0.58893238	0.21513882	57.5555162	1.57555516	0.65586027	-1.17260533
cg24459792	LAPTM5	0.57348659	0.4770304	0.6819368	0.2049064	42.9545796	1.4295458	0.51555684	-1.17260533
cg12732155		0.42447609	0.35206697	0.53469979	0.18263282	51.8744542	1.51874454	0.60287922	-1.17260533
cg19510565		0.67488561	0.57540782	0.75734544	0.18193763	31.6189013	1.31618901	0.39636668	-1.17260533
cg17418085		0.57638891	0.50296091	0.66746959	0.16450868	32.7080443	1.32708044	0.40825582	-1.17260533
cg06085204		0.28430002	0.27095592	0.53737642	0.2664205	98.3261393	1.98326139	0.98787484	-1.13519273
cg17753212	XAF1	0.15976321	0.18162153	0.4410352	0.25941366	142.831996	2.42831996	1.27959583	-1.13519273
cg20803910		0.16689524	0.20116857	0.45440887	0.2532403	125.848621	2.25848621	1.17558605	-1.13519273
cg13013900		0.13882378	0.17622702	0.41918145	0.24295443	137.864458	2.37864458	1.25013972	-1.13519273
cg05513208		0.23737021	0.23180959	0.4719273	0.24011771	103.584029	2.03584029	1.02562438	-1.13519273
cg26502852		0.30051741	0.26009928	0.48656322	0.22646395	87.0682723	1.87068272	0.90356489	-1.13519273
cg09251764	RASSF5	0.20798903	0.24217928	0.41114612	0.16896684	69.769319	1.69769319	0.76357576	-1.13519273
cg27146152		0.10630346	0.123575	0.29234959	0.16877459	136.576643	2.36576643	1.24230765	-1.13519273
cg20695475		0.46659175	0.50510761	0.7357349	0.23062728	45.6590391	1.45659039	0.54259523	-1.00654515
cg07380021		0.47960226	0.42496992	0.6052356	0.18026578	42.4184906	1.42418491	0.51013647	-1.00654515
cg15855555		0.63273774	0.55740979	0.71198305	0.15457327	27.7306339	1.27730634	0.35310457	-1.00654515
cg19638572	TSPYL5	0.54862668	0.47674701	0.58859954	0.1185253	23.4616116	1.23461612	0.30406253	-1.00654515
cg00032205		0.25364822	0.27974833	0.62879452	0.34904619	124.7715	2.247715	1.16845912	-2.27114715
cg22319311		0.26689362	0.3492569	0.6326205	0.2833636	81.1332838	1.81133284	0.85705167	-2.27114715
cg18233405		0.04375623	0.21602088	0.49893186	0.28291098	130.964643	2.30964643	1.20767202	-2.27114715

8 ANHANG

cg04917181		0.09475815	0.34489966	0.58562135	0.24072169	69,7947003	1,697947	0,76379143	-2,27114715
cg00186701		0.56502515	0.46096327	0.69913343	0.23817016	51,6679243	1,51667924	0,60091601	-2,27114715
cg08858210		0.34429107	0.33195747	0.54150745	0.20954998	63,1255517	1,63125552	0,70598278	-2,27114715
cg00249621		0.39948993	0.37577807	0.54221776	0,1664397	44,2920198	1,4429202	0,52899151	-2,27114715
cg11498607	RUNX1	0.50397591	0.3572058	0.65494565	0.29773985	83,3524682	1,83352468	0,87461969	-0,9533722
cg04228935		0.26570999	0.22803322	0.51682765	0.28879443	126,645772	2,26645772	1,18043925	-0,9533722
cg15242225		0.55459575	0.37979282	0.6482819	0.26848908	70,6935651	1,70693565	0,77140867	-0,9533722
cg13030790		0.57623601	0.45983637	0.70456702	0.24473065	53,2212485	1,53221249	0,61561638	-0,9533722
cg19836199		0.64562574	0.51073057	0.7362434	0.22551283	44,1549494	1,44154949	0,52762037	-0,9533722
cg05000748		0.4461664	0.33449399	0.53949918	0.20500519	61,2881552	1,61288155	0,68964049	-0,9533722
cg04915566		0.69943978	0.58928807	0.79425886	0.20497079	34,7827824	1,34782782	0,43063621	-0,9533722
cg08443845		0.67689408	0.57448562	0.77632557	0.20183995	35,1340307	1,35134031	0,43439103	-0,9533722
cg01519261		0.64209435	0.57433642	0.72992928	0.15559286	27,0908922	1,27090892	0,34586065	-0,9533722
cg21908110		0.29226804	0.26284402	0.56788571	0.30504169	116,054264	2,16054264	1,1113937	-1,10651016
cg04540383	0.21790491	0.24292858	0.48257231	0.23964373	98,6478098	1,9864781	0,99021289	-1,10651016	
cg04743654	0.1828	0.31227994	0.5253769	0.21309696	68,2390789	1,68239079	0,75051286	-1,10651016	
cg06172942	0.41590556	0.37524978	0.58631236	0.21106258	56,2458906	1,56245891	0,64381825	-1,10651016	
cg24859722	0.37269703	0.40852902	0.61638143	0.20785241	50,8782471	1,50878247	0,59338482	-1,10651016	
cg25486143	0.26733273	0.30947963	0.51462854	0.20514891	66,2883397	1,6628834	0,73368701	-1,10651016	
cg00777121	0.22304361	0.25279274	0.45265072	0.19985799	79,0600207	1,79060021	0,84044326	-1,10651016	
cg13872831	0.15410495	0.28524605	0.47887093	0.19362488	67,8799501	1,6787995	0,74729994	-1,10651016	
cg25747192	0.25182338	0.29304295	0.48363051	0.19058756	65,0374159	1,65037416	0,72279314	-1,10651016	
cg08047457	0.30583269	0.3032907	0.48745236	0.18416167	60,7211718	1,60721172	0,68455999	-1,10651016	
cg03297783	0.22595196	0.20178154	0.37614017	0.17435864	86,4096802	1,86409608	0,89647622	-1,10651016	
cg12966367	0.14446985	0.20945985	0.38051132	0.17105146	81,663126	1,81663126	0,64512661	-1,10651016	
cg21372200	0.44178879	0.36783071	0.52085986	0.15302916	41,6031494	1,41603149	0,50185335	-1,10651016	
cg27569446	0.17841635	0.3094265	0.45316521	0.14373872	46,4532671	1,46453267	0,55044038	-1,10651016	
cg06980053	0.41629436	0.35777663	0.4947622	0.13698556	38,2880124	1,38288012	0,4676761	-1,10651016	
cg21554552	0.13249562	0.26691886	0.40265558	0.13573672	50,8531763	1,50853176	0,59314507	-1,10651016	
cg23882545	0.38913682	0.17680188	0.51275767	0.33595579	190,018227	2,90018227	1,53614357	0,0407685	
cg25748441	0.41201508	0.21725263	0.52945959	0.25920696	143,706875	2,43706875	1,28514695	0,0407685	
cg20418725	0.40932313	0.2060121	0.50738124	0.30136914	146,287108	2,46287108	1,30034111	0,0407685	
cg27410837	0.2984765	0.1658831	0.43675438	0.27118607	163,759184	2,63759184	1,39922133	0,0407685	
cg14962032	0.27893538	0.13054125	0.38578478	0.25524353	195,527098	2,95527098	1,56329042	0,0407685	
cg26842802	0.60853222	0.49826958	0.74402228	0.24575271	49,3212342	1,49321234	0,57841934	0,0407685	
cg23061725	0.17386056	0.62746185	0.80728323	0.13482139	20,0489272	1,20048927	0,26362251	0,0407685	
cg00978584	0.09357406	0.06902666	0.17405238	0.10502572	152,152391	2,52152391	1,33429591	0,0407685	

Tabelle 10: Differentiell methylierte Regionen zwischen G2 und G1

Chromosom	Start	Ende	Wert	Fläche	P-Wert	fwer	P-Wert der Fläche	fwer der Fläche	Länge (bp)	assoziierte Gene
chr20	50720331	50721313	0,24600295	1,23001477	0,00179504	0,01	0,0044876	0,02	982	ZFP64, SALL4
chr5	176830667	176831638	0,24945706	1,24728532	0,00171345	0,009	0,0044876	0,02	971	RGST4, PFN3, LMAN2, HNF4a, R3HDM1L
chr20	42983920	42984878	-0,28328009	3,39936103	0	0	8,16E-05	0,001	958	
chr11	130029515	130030459	0,26173776	1,83216431	0,00048956	0,002	0,00155026	0,007	944	
chr19	17516282	17517221	0,2887357	2,02114993	8,16E-05	0,001	0,00122389	0,006	939	BST2
chr3	185911316	185912253	0,25550207	1,78851448	0,00073433	0,003	0,00163185	0,007	937	DGKG
chr1	204328377	204329307	0,25731644	2,31584793	0,00065274	0,002	0,00089752	0,004	930	
chr12	115137528	115138445	0,25507984	1,53047907	0,00089752	0,003	0,00261097	0,011	917	TBX3
chr4	3371291	3372206	0,27755543	2,22044343	8,16E-05	0,001	0,00097911	0,004	915	RGSI2
chr1	172113506	172114419	0,2375679	1,42540742	0,00203982	0,011	0,00301893	0,015	913	DNM3OS
chr7	100230781	100231672	0,25138622	1,00554489	0,00195822	0,009	0,00685379	0,033	891	PCOLCE
chr17	79258813	79259699	0,25118498	1,5071099	0,00097911	0,004	0,00261097	0,011	886	
chr3	170137321	170138205	0,2361046	1,18052298	0,00301893	0,014	0,00465078	0,021	884	SKIL, CLDN11
chr20	22549253	22550129	0,29109745	1,16438979	0,00024478	0,001	0,00481397	0,022	876	FOX2A
chr2	241458947	241459847	0,23499296	1,17496478	0,00318211	0,014	0,00465078	0,021	873	ANKMY1, DUSP28
chr11	3134478	314341	0,30670813	1,84024876	0	0	0,00155026	0,007	863	
chr19	50037018	50037880	0,27438187	1,6462912	0,00032637	0,001	0,00212141	0,008	862	RPL13A
chr4	779480	780336	0,27521147	1,37605736	0,00040796	0,001	0,00326371	0,015	856	CPLX1
chr10	214152805	214153645	0,24820165	1,98561323	0,00081593	0,004	0,00122389	0,006	840	PROX1
chr1	77167715	77168553	0,33780183	1,35120734	0	0	0,00326371	0,015	838	ZNF503
chr2	44065056	44065893	-0,24285371	3,39995192	0	0	8,16E-05	0,001	837	ABC35, ABC38, PROCA1, FOXN1
chr17	27038686	27039523	0,29615512	2,36924097	0	0	0,00089752	0,004	837	
chr2	128180488	128181325	0,27491126	1,64946756	0,00032637	0,001	0,00212141	0,008	837	IWS1, PROC
chr17	40274524	40275359	-0,29319592	2,93195921	0	0	0,00048956	0,003	835	DHX58, KAT2a
chr6	22960257	22961088	0,288659	3,17524898	8,16E-05	0,001	0,00016319	0,002	831	TNFRSF10C
chr4	4863282	4864110	0,24469964	1,22344821	0,00179504	0,01	0,0044876	0,02	828	MSX1
chr2	227655596	227656417	0,30227166	1,81362997	8,16E-05	0,001	0,00163185	0,007	821	IRS1
chr15	41793472	41794293	0,2611927	1,04477079	0,0011423	0,004	0,00660901	0,031	821	ITPKA
chr1	29586299	29587117	0,26169069	2,09352555	0,00048956	0,002	0,0011423	0,005	818	PTPRU, SRSF4
chr17	36717733	36718549	0,27455184	0,82365553	0,00073433	0,002	0,0122389	0,056	816	SRICN1
chr14	61121516	61122327	0,25757032	1,28785162	0,0011423	0,005	0,00398804	0,019	811	SIX1,4,6
chr1	116710530	116711339	0,31784336	1,5892168	0	0	0,00236619	0,01	809	MAB2L3
chr3	72226488	72227234	0,23351987	1,16759987	0,0033453	0,016	0,00473238	0,022	806	
chr20	39311637	39312434	0,25552698	1,02210793	0,00155026	0,006	0,0066906	0,032	797	MAFb
chr12	104697193	104697983	0,27269256	3,54500324	0	0	8,16E-05	0,001	790	EID3
chr7	20816184	20816971	0,29264723	1,75588339	8,16E-05	0,001	0,00163185	0,007	787	SP8
chr15	96886018	96886805	0,27823521	1,39117803	0,00024478	0,001	0,00326371	0,015	787	NR2F2
chr5	66461884	66462662	0,31734817	1,26393266	0	0	0,00416123	0,019	778	CD180
chr14	38091400	38092175	0,26731209	1,87118462	0,00032637	0,002	0,00146867	0,006	775	FOXA1
chr19	13947469	13948243	0,28586827	1,42934134	0,00016319	0,001	0,00293734	0,014	774	ZSWIM4, MIR24-2
chr2	242749937	242750705	-0,27303238	1,63819426	0,00032637	0,001	0,002203	0,009	768	NEU4
chr13	33924537	33925376	0,26232776	1,04931104	0,0010607	0,004	0,00660901	0,031	759	STAR13-AS
chr11	46740032	46740790	-0,26710013	1,33550064	0,00065274	0,003	0,00367167	0,018	758	ARHGAP1, ZNF408
chr19	58220080	58220837	0,38614759	4,24762349	0	0	0	0	757	ZNF551
chr6	11593039	11593796	0,26941042	1,6164825	0,00032637	0,001	0,002203	0,009	757	GATA4
chr17	81033384	81034137								

8 ANHANG

chr10	126712230	126712941	-0,2574644	0,77239319	0,00203982	0,008	0,01281005	0,059	711	CTBP2, ZRANB1
chr19	1132256	1132966	0,2804829	2,80484292	8,16E-05	0,001	0,00048956	0,003	710	GPX4
chr19	11784246	11784955	0,31225917	3,12259173	0	0	0,00024478	0,002	709	ZNF833P
chr12	30353957	30354663	0,28597832	1,14391328	0,00024478	0,001	0,000505875	0,023	706	
chr5	17659563	176560265	0,31366844	1,56834221	0	0	0,00252937	0,011	702	FGFR4, NSD1
chr5	76373022	76373719	0,28358156	1,13432624	0,00024478	0,001	0,00522193	0,023	697	ZBED3, AGF1
chr17	4648566	4649262	0,25773859	1,54643153	0,00089752	0,003	0,00261097	0,011	696	ARRB2
chr11	64814948	64815642	0,25452036	1,01808142	0,00155026	0,006	0,0066906	0,032	694	ARL2, SNX15
chr3	53529387	53530075	0,28387579	1,41937897	0,00016319	0,001	0,00301893	0,015	688	CACNA1D
chr2	228678005	228678693	-0,2441946	0,7325838	0,000505875	0,021	0,01460509	0,061	688	CCL20
chr11	1326508	1327193	-0,24030689	1,44184136	0,00171345	0,01	0,00293734	0,014	685	TOLLIP, MUC5B
chr7	27160276	27160960	-0,23099158	1,15495792	0,00375326	0,018	0,00489556	0,023	684	HOXA4
chr2	97193006	97193688	0,25266556	1,51599338	0,00097911	0,004	0,00261097	0,011	682	NEURL3
chr8	38644939	38645613	0,254846	1,01938399	0,00155026	0,006	0,0066906	0,032	674	TACC1
chr2	119067552	119068223	0,32110883	2,56887065	0	0	0,00073433	0,003	671	INSIG2
chr12	54070527	54071194	0,30057722	3,30634942	0	0	8,16E-05	0,001	667	HOXC SP1
chr4	10020360	10021025	0,27075558	1,35377788	0,00040796	0,001	0,00326371	0,015	665	WDR1
chr10	114133235	114133900	-0,31451338	1,25805353	8,16E-05	0,001	0,00440601	0,02	665	ACSL5, TECTB
chr15	52404232	52404887	0,24499077	0,73497231	0,00497715	0,021	0,01460509	0,061	655	GNB5
chr19	36523405	36524058	0,24814422	0,99257687	0,00244778	0,01	0,00718016	0,033	653	SDHAF
chr16	68269041	68269694	-0,23667502	0,94670009	0,00432441	0,018	0,00791449	0,036	653	ESRP2, NFATC3
chr3	181428046	181428697	0,28192271	4,22884059	0	0	0	0	651	SOX2
chr20	42187103	42187750	-0,27717351	1,66304107	0,00016319	0,001	0,00203982	0,008	647	SGK2, L3MBTL1
chr1	152086623	152087267	-0,27180331	1,08721324	0,00057115	0,002	0,00611945	0,028	644	TCHH
chr5	59783906	59784544	-0,26222665	0,78667994	0,00138708	0,004	0,01248368	0,058	638	PART1
chr8	145025128	145025760	0,23333908	0,93335632	0,00514034	0,022	0,00815927	0,037	632	PLEC, PARP10
chr1	184944153	184944785	-0,29034557	0,8710367	0,00040796	0,001	0,01060705	0,049	632	
chr7	96642163	96642794	0,36233189	1,81165947	0	0	0,00163185	0,007	631	DLX5, DLX6
chr11	124413574	124414205	-0,23017517	0,6905255	0,01215731	0,047	0,01819517	0,069	631	OR8B
chr11	65307616	65308245	0,27167227	0,8150168	0,00081593	0,003	0,01240209	0,058	629	MALAT1
chr10	74714308	74714935	-0,29093328	1,1637331	0,00024478	0,001	0,00481397	0,022	627	OIT3, PLAG2G12B
chr1	19665131	19665757	-0,26579204	1,59475222	0,00065274	0,002	0,00236619	0,01	626	PLC2
chr7	100488398	100489022	0,28179887	1,40899434	0,00016319	0,001	0,00310052	0,015	624	UFSP1, ACHE, EPHB4
chr10	102589545	102590168	0,25126808	0,75380424	0,00326371	0,015	0,01346279	0,059	623	PAX2
chr20	61695598	61696220	-0,24679109	0,74037328	0,00456919	0,019	0,01419713	0,06	622	BHLH23
chr7	87848143	87848763	0,2802787	1,96195092	8,16E-05	0,001	0,00122389	0,006	620	SRI
chr17	59534637	59535253	0,29571184	1,77427106	8,16E-05	0,001	0,00163185	0,007	616	TBX2, TBX4
chr22	19709548	19710163	-0,29646354	1,48231772	8,16E-05	0,001	0,00277415	0,013	615	SEPT5, TBX1
chr1	3154700	3155312	-0,30583598	0,91750794	0,00016319	0,001	0,0088936	0,044	612	
chr17	36719773	36720382	0,30070431	0,90211292	0,00024478	0,001	0,00954634	0,047	609	SRCIN1
chr10	31422942	31423550	0,28059348	0,84178045	0,00040796	0,001	0,01174935	0,053	608	ZEB1
chr2	2126727	21267334	-0,23815755	2,38157549	0,00073433	0,004	0,00089752	0,004	607	APOB
chr14	65009101	65009707	0,24587749	0,98350995	0,00252937	0,011	0,00718016	0,033	606	ZBTB1
chr1	156877970	156878573	-0,24936137	1,24680687	0,00171345	0,009	0,0044876	0,02	603	NTRK1, INSR, HOXA10, EVX1
chr7	27252541	27253143	0,2494706	0,74841181	0,00391645	0,016	0,01370757	0,059	602	
chr12	14413090	14413690	0,23757046	0,95028184	0,00424282	0,018	0,00791449	0,036	600	
chr3	38035463	38036060	0,36677644	2,56743509	0	0	0,00073433	0,003	597	VILL, PLCD1
chr3	158390074	158390671	0,27764564	2,22116515	8,16E-05	0,001	0,00097911	0,004	597	GFM1, LXN
chr17	79958316	79958912	-0,26355829	1,05423315	0,00097911	0,003	0,00652742	0,031	596	NOTUM
chr13	20767968	20768560	0,30660155	2,14621087	0	0	0,00114223	0,005	592	GJB2
chr2	102803985	102804576	0,34314584	1,02943751	0	0	0,0066906	0,032	591	IL1RL2
chr5	95768418	95769008	0,27071598	1,6242959	0,00032637	0,001	0,002203	0,009	590	PCSK1
chr3	185080816	185081403	0,30492784	1,82956702	0	0	0,00155026	0,007	587	MAP3K13
chr1	26686587	26687174	0,30934541	1,54672705	0	0	0,00261097	0,011	587	CD52, AIM1L, Lin28A
chr11	70507825	70508410	0,27252221	2,18017766	0,00024478	0,001	0,0010607	0,005	585	SHANK2
chr17	74136395	74136978	0,23924793	0,7177438	0,00758812	0,031	0,01591057	0,065	583	FOXJ1
chr3	50275112	50275694	0,25300875	1,5180525	0,00097911	0,004	0,00261097	0,011	582	GNAT1, GNAT2
chr8	38585602	38586183	0,2961465	1,48073249	8,16E-05	0,001	0,00277415	0,013	581	TACC1
chr2	27958142	27958722	0,31399875	2,19799127	0	0	0,00097911	0,004	580	SLC4A1AP
chr2	23379232	233793311	0,23336106	0,93344424	0,00514034	0,022	0,00815927	0,037	579	NGEF
chr1	9555113	9555691	0,24270395	1,69892766	0,00097911	0,005	0,00171345	0,007	578	
chr14	95027530	95028105	-0,27311412	1,0924565	0,00057115	0,002	0,00603786	0,027	575	SERPINA2
chr11	62477052	62477624	0,27028307	2,43254767	0,00024478	0,001	0,00081593	0,003	572	UBXN1, BSCL2, GNG3
chr3	186490344	186490915	0,2672145	1,60328702	0,00048956	0,002	0,00236619	0,01	571	KNG1
chr5	67483109	67483678	0,2619988	0,7859964	0,00138708	0,004	0,01248368	0,058	569	PIK3R1
chr15	58723657	58724225	-0,29293105	1,46465523	8,16E-05	0,001	0,00285574	0,013	568	LIPC
chr1	226012347	226012913	-0,26158934	0,78476802	0,00138708	0,004	0,01248368	0,058	566	EPHX1, LEFTY1
chr8	98289745	98290310	0,26568219	1,32841094	0,00081593	0,003	0,00383486	0,018	565	TSPYL5
chr8	27449716	27450279	0,32216998	2,25518989	0	0	0,00097911	0,004	563	CLU, EPHX2
chr10	101841253	101841816	-0,29043948	1,74263686	0,00016319	0,001	0,00163185	0,007	563	CPN1
chr2	128175891	128176454	-0,27932683	1,11730733	0,00024478	0,001	0,00546671	0,024	563	PROC, IWS1, ERCC3
chr7	150434077	150434640	0,24470593	0,97882373	0,00252937	0,011	0,00718016	0,033	563	GIMAP2, GIMAP1
chr12	53358946	53359506	0,29122556	1,16490223	0,00024478	0,001	0,00473238	0,022	560	KRT18
chr10	7744631	7745191	-0,26090291	0,78270874	0,00146867	0,004	0,01248368	0,058	560	ITIH2, ITIH5
chr1	151811364	151811923	0,2673534	0,8020602	0,0010607	0,003	0,01240209	0,058	559	THEM, RORC
chr16	51187572	51188129	0,29348497	1,17393988	0,00016319	0,001	0,00465078	0,021	557	SALL1
chr12	7848093	7848647	0,25211144	0,75633433	0,00293734	0,012	0,01329961	0,059	554	GDF3, NANOG
chr1	248366332	248366883	-0,24549828	0,73649483	0,00497715	0,021	0,01460509	0,061	551	OR2M5
chr15	42749336	42749885	0,23191805	0,69575414	0,01109661	0,042	0,0178688	0,069	549	ZNF106
chr12	48592270	48592818	0,2189022	1,094511	0,00571149	0,027	0,00603786	0,027	548	DTX3, KIF5, GLI
chr17	7797453	7797997	-0,26641493	1,59848959	0,00065274	0,002	0,00236619	0,01	544	
chr1	151103642	151104186	0,29523049	1,18092197	0,00016319	0,001	0,00465078	0,021	544	SEMA6C
chr4	987108	987652	-0,26714507	1,06858028	0,00081593	0,003	0,00628264	0,028	544	DGKQ, IDUA, TMEM175
chr19	50031017	50031560	0,30514872	1,5257436	0	0	0,00261097	0,011	543	
chr7	100224015	100224557	0,26537637	1,32688186	0,00081593	0,003	0,00383486	0,018	542	TFR2, PCOLCE
chr19	46916520	46917061	0,25711374	1,28556871	0,00114223	0,005	0,00399804	0,019	541	HIF3A
chr18	32847251	32847789	0,24692946	1,2346473	0,00179504	0,01	0,0044876	0,02	538	ZNF397
chr3	133393119	133393656	0,29894897	1,19579589	0,00016319	0,001	0,00456919	0,02	537	TOPBP1

8 ANHANG

chr10	101542449	101542983	-0,32659542	0,97978625	0	0	0,00718016	0,033	534	ABCC2, NANOGP6
chr1	1072370	1072902	0,27764427	1,11057707	0,00032637	0,001	0,0056299	0,026	532	RNF223, HES4
chr12	58007090	58007622	-0,26939291	0,80817872	0,00081593	0,003	0,01240209	0,058	532	
chr13	114109420	114109949	-0,22653385	1,13266925	0,00424282	0,019	0,00522193	0,023	529	ADPRHL1
chr2	42328410	42328937	0,25709266	0,77127799	0,00203982	0,008	0,01281005	0,059	527	PKDCC
chr17	80847137	80847662	-0,25593713	1,53562281	0,00089752	0,003	0,00261097	0,011	525	B3GNTL1
chr14	103394899	103395423	0,24787033	0,743611	0,00424282	0,017	0,01387076	0,059	524	AMN
chr1	159750831	159751352	0,29347782	1,1739113	0,00016319	0,001	0,00465078	0,021	521	APCS, DUSP23
chr8	22223465	22223985	-0,25302943	1,0121177	0,00171345	0,007	0,00677219	0,032	520	PIWIL2
chr11	58207266	58207784	-0,2461107	0,73833211	0,00473238	0,02	0,01436031	0,06	518	OR5B
chr1	44031309	44031826	0,24395785	0,73187355	0,00530352	0,021	0,01468668	0,061	517	PTPRF
chr1	207262190	207262706	-0,26551157	1,06204627	0,00097911	0,003	0,00636423	0,029	516	PFKFB2
chr16	3068014	3068529	0,30851853	3,08518533	0	0	0,00024478	0,002	515	KREMEN2, CLDN6, CLDN9
chr2	164204829	164205343	0,31320669	1,56603346	0	0	0,00252937	0,011	514	
chr7	27155548	27156062	0,26541515	0,79624546	0,00122389	0,003	0,01240209	0,058	514	HOXA1, HOXA2
chr16	8806531	8807043	0,26520429	3,18245151	0	0	0,00016319	0,002	512	ABAT, USP7
chr1	12227417	12227927	0,27159937	1,08639746	0,00057115	0,002	0,00611945	0,028	510	TNFRSF8
chr15	53086726	53087232	0,27858728	1,39293639	0,00024478	0,001	0,00326371	0,015	506	ONECUT1
chr19	46503907	46504412	0,30578913	1,22315651	8,16E-05	0,001	0,0044876	0,02	505	IGFL4
chr1	154127537	154128041	0,24438487	1,22192433	0,00179504	0,01	0,0044876	0,02	504	TPM3
chr10	105420501	105421005	0,22108656	0,88434624	0,00921997	0,044	0,0100359	0,048	504	
chr15	53093007	53093509	0,30015184	0,90045553	0,00024478	0,001	0,00954634	0,047	502	ONECUT1
chr10	103880979	103881480	0,2608066	1,30403302	0,00089752	0,003	0,00391645	0,018	501	HPS6, LDB1, PITX3
chr12	115103960	115104460	0,24349263	0,97397053	0,00293734	0,012	0,00742493	0,034	500	TBX3
chr22	51111217	51111714	0,25789547	0,51579093	0,00489556	0,023	0,03198433	0,102	497	SHANK3, MAPKBIP2
chr21	36421472	36421955	0,23668716	1,1834358	0,00285574	0,013	0,00456919	0,02	483	RUNX1
chr18	13611370	13611824	0,2817851	1,97249567	8,16E-05	0,001	0,00122389	0,006	454	
chr9	110228216	110228655	0,31427922	0,94283767	8,16E-05	0,001	0,00799608	0,036	439	KLF4
chr21	43135854	43136287	-0,23282651	0,93130604	0,00530352	0,023	0,00824086	0,038	433	RIPK4
chr18	77157760	77158180	-0,29867363	0,8960209	0,00024478	0,001	0,00970953	0,047	420	NFATC1
chr21	47575134	47575547	-0,29532163	1,47660814	8,16E-05	0,001	0,00277415	0,013	413	COL6A2
chr9	138669066	138669392	-0,25092249	0,50184498	0,00775131	0,035	0,0335346	0,106	326	KCNT1
chr9	95947146	95947396	0,27370542	0,54741083	0,00171345	0,006	0,03002611	0,097	250	WNK2

Tabelle 11: Assoziation klinischer Parameter mit G1- und G2-HCCs

Parameter	P-Wert
Wnt-Signalweg (MUT)	0,1667
Event	0,4286
Subtyp (fibrolamelläres HCC)	0,4643
Extrahepatisches Wachstum	0,4643
16-Gen-Signatur (C2)	0,5000
Metastasierung	0,5000
Multifokalität	1,0000
Alter (> 8 Jahre)	1,0000
PRETEXT (IV)	-

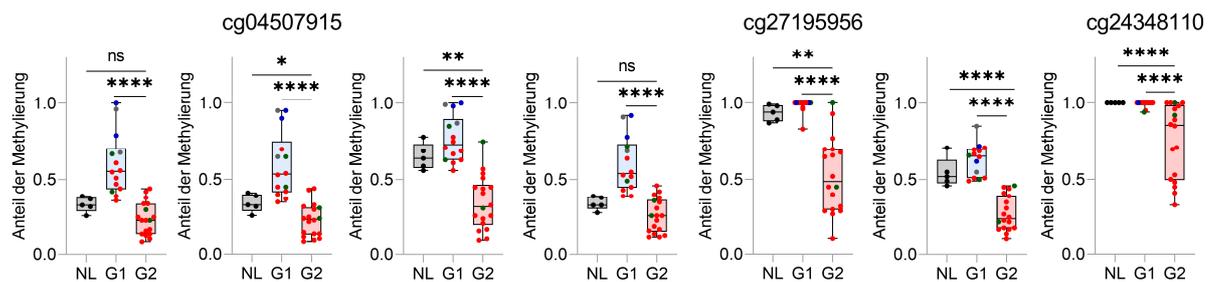


Abbildung 30: Darstellung der Pyrosequenzierergebnisse pro gemessenes CpG in 5 NL-, 14 G1- und 18 G2-Proben. NL: schwarze Punkte, HB: rote Punkte, HCC: grüne Punkte, fHCC: blaue Punkte, MRT: graue Punkte.

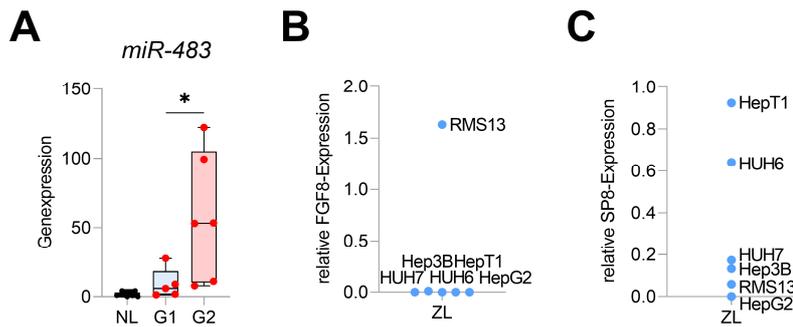


Abbildung 31: (A) Boxplot-Darstellung der normalisierten *counts* von miR-483 pro Patientenprobe kategorisiert nach den epigenetischen Clustern NL (schwarz), G1 (hellblau) und G2 (rot). Schwarze Punkte manifestieren NL-Proben, rote Punkte manifestieren HB-Proben. (B+C) *FGF8*- (B) bzw. *SP8* (C)-Expression in Hepatomzelllinien. Die mRNA-Werte sind als relative Expressionswerte dargestellt. Die Analyse wurde mittels RT-Q-PCR durchgeführt und mit dem *Housekeeping*-Gen *TBP* normalisiert.

Generierung von pcDNA3-SP8-VSV, pRTR-SP8-VSV und Hep3B-Pool-Zellen

Für die Erstellung des pcDNA3-SP8-VSV-Vektors wurde zunächst die *SP8* cDNA durch spezifische Primer, welche eine BamHI bzw. eine EcoRI-Schnittstelle aufwiesen (Primer #1, Abschnitt 2.9), vom pCMV/Tag2B/FLAG/SP8-Vektor als Template PCR-amplifiziert und durch die angehängten Schnittstellen in den pcDNA3-VSV-Vektor ligiert (Abb. 22A, oben). Um im Weiteren den episomalen pRTR-SP8-VSV-Vektor zu generieren, wurde der von Jackstadt et al. kürzlich publizierte episomale pRTR-Vektor als Backbone genutzt und die Klonierung analog zu Jackstadt et al. 2013¹¹⁷ vorgenommen. Dafür wurde der *SP8-VSV open reading frame* (ORF) mit Hilfe der beiden Restriktionsendonukleasen BamHI und NheI aus pcDNA3-SP8-VSV herausgeschnitten, zur Übertragung der SfiI-Schnittstelle in den Shuttle-Vektor pUC19 eingebracht, an den SfiI-Seiten erneut herausgelöst und letztlich in den episomalen pRTR-Vektor ligiert (Abb. 22A).

Der Hep3B-Pool wurde dann durch die Transfektion mit pRTR-SP8-VSV, einer anschließenden Puromycin-Selektion mit 2 µg/ml für 10 Tage, sowie durch *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS)-Selektion gewonnen (Abb. 22B) und seine Qualität auf RNA- und Protein-Ebene validiert (Abb. 22C).

Etablierung und Optimierung von CRISPR interference

Die Etablierung von *CRISPR interference* startete mit einem Restriktionsverdau via BamHI zur Entfernung des Sun-Tags aus dem als *Backbone* benutzten pPlat-gRNA2-TET1-Plasmids¹¹⁶, welches neben einem deaktivierten Cas9-Enzym (dCas9) auch für eine gRNA-Expressionskassette codierte. Die KRAB-Domäne wurde durch zwei spezifische Primer, die mit einer NheI und NotI-Restriktionsseite versehen waren (Primer #2, Abschnitt 2.9), aus pLKO5d.SFFV.dCas9-KRAB.P2A.BSD PCR-amplifiziert und in das pPlat-gRNA2-TET1-Plasmid (ohne Sun-Tag) kloniert und damit das unfertige pPlat-dCas9-sfGFP-KRAB (kein ORF)

erstellt. Um einen durchlaufenden ORF zwischen dCas9 und sfGFP-KRAB zu generieren, wurde die sfGFP-KRAB-Domäne mit zwei BamHI-enthaltenden spezifischen Primern (Primer #3, Abschnitt 2.9) PCR-amplifiziert und wieder in den pPlat-dCas9-sfGFP-KRAB-Vektor eingefügt (Abb. 32A, oben). Der leere Kontrollvektor pPlat-dCas9 wurde durch BamHI-Verdau von pPlat-gRNA2-TET1 und anschließender Religation erhalten (Abb. 32A, unten).

Die letztendlich korrekte Expression des Fusionskonstrukts dCas9-sfGFP-KRAB wurde mittels Western Blot-Analyse überprüft (Abb. 32B). Die Funktionalität des Plasmids wurde im Anschluss durch einen Luciferase Assay bestimmt (Abb. 32C). Dazu wurden gRNAs designed, die sich gegen den Transkriptionsstart des pRL-CMV-Vektors richteten (Abb. 32C, oben), um eine Blockierung der *Renilla*-Luciferaseaktivität zu ermöglichen. Im Vergleich zum Kontrollplasmid pPlat-dCas9, konnte durch gRNA-CMV zusammen mit dem pPlat-dCas9-sfGFP-KRAB-Plasmid eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität erzielt werden (Abb. 32C, unten), was auf die korrekte Funktionalität schließen ließ. Für den eigentlichen *FGF8*-Knock-down wurden fünf weitere gRNAs, welche um den Transkriptionsstart als Zielsequenz lokalisiert waren, mit dem Programm *CRISPOR* designed. Um diese schnell und einfach zu verifizieren, wurde die *FGF8*-Expression in mehreren Zelllinien bestimmt und RMS13-Zellen, welche die höchste *FGF8*-Expression aufwiesen (siehe Anhang, Abb. 31B), als Testmodell ausgewählt. Die gRNA-1 erzielte dabei eine Reduktion der *FGF8*-Expression in RMS13-Zellen um 78% (Abb. 32D) und wurde somit für die weiteren Experimente herangezogen.

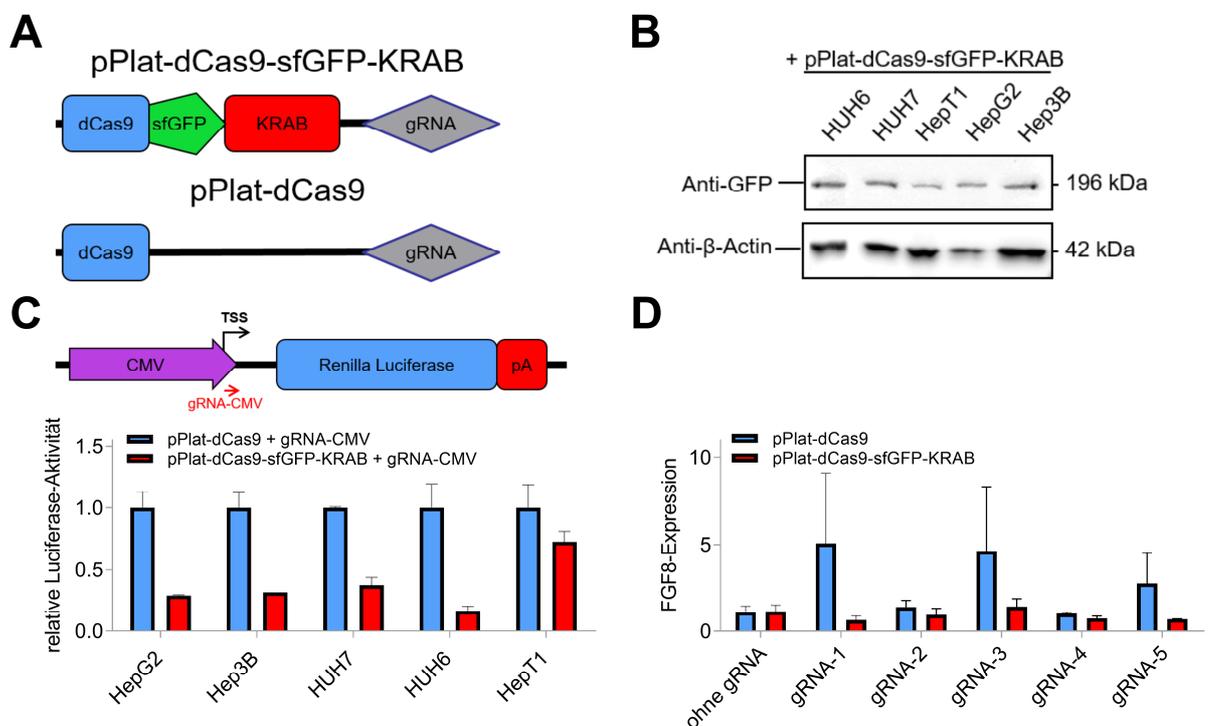


Abbildung 32: (A) Schematische Darstellung des *CRISPR interference*-Fusionskonstrukts pPlat-dCas9-sfGFP-KRAB bzw. des Kontrollvektors pPlat-dCas9. (B) Protein-Nachweis des dCas9-sfGFP-KRAB-Fusionskonstrukts 48 h nach Transfektion der Hepatomzelllinien und Detektion mit dem anti-GFP-Antikörper. Die Standardisierung der

Proteinmenge erfolgte mit β -Actin. (C) Schematische Darstellung des pRL-CMV-Vektors mit dem CMV-Promotor, der *Renilla*-Luciferase und der Poly-A-Domäne (pA), sowie der Lokalisation der Transkriptionsstartstelle (TSS) und der gRNA-CMV, die zur Blockierung der Luciferase-Aktivität designed wurde (oben). Säulendigramm des Luciferase-Assays 72 h nach Transfektion mit pPlat-dCas9-sfGFP-KRAB + gRNA-CMV oder zur Kontrolle pPlat-dCas9 + gRNA-CMV in fünf Hepatomzelllinien (unten). (D) Bestimmung der *FGF8*-Expression in RMS13-Zellen 72 h nach Transfektion mit pPlat-dCas9 und pPlat-dCas9-sfGFP-KRAB ohne bzw. mit den guideRNAs gRNA-1-5 mittels RT-Q-PCR. Die Expression wurde zum *Housekeeping*-Gen *TBP* normalisiert.

9 PUBLIKATIONEN

Während meiner Zeit als Doktorandin konnte ich zu folgenden Publikationen beitragen:

Beck A[#], Trippel F[#], **Wagner AE**, Joppien S, Felle M, Vokuhl C, Schwarzmayr T, Strom TM, von Schweinitz D, Längst G, Kappler R. (2018). "Overexpression of UHRF1 promotes silencing of tumor suppressor genes and predicts outcome in hepatoblastoma." Clin Epigenetics. 2018 Mar 2; 10:27.

Weiss JBW[#], **Wagner AE**[#], Eberherr C, Häberle B, Vokuhl C, von Schweinitz D, Kappler R. (2020). „High expression of IGF2-derived intronic miR-483 predicts outcome in hepatoblastoma." Cancer Biomarkers. 2020 28(3):321-328.

[#]Gleichberechtigte Erstautoren

Wagner AE, Schwarzmayr T, Häberle B, Vokuhl C, Schmid I, von Schweinitz D und Kappler R. (2020). „SP8 promotes an aggressive phenotype in hepatoblastoma via FGF8 activation." Cancers. 2020 12(8), 2294.

Wagner AE[#], Jiang T[#], Häberle B, Vokuhl C, Schmid I, Hubertus J, von Schweinitz D und Kappler R. „Epigenetic activation of TRIM71 in high-risk hepatoblastoma sustains stemness-like properties". (in Vorbereitung).

[#]Gleichberechtigte Erstautoren

10 DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. von Schweinitz und Herrn Prof. Dr. Kappler dafür danken, dass Sie mir die Gelegenheit einräumten, meine Doktorarbeit an der Kinderchirurgischen Klinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals durchzuführen.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Kappler für die Möglichkeit danken, Teil dieses spannenden Forschungsfeldes zu werden und ohne Restriktionen an dieser interessanten und fordernden Thematik arbeiten zu können. Besonderer Dank soll Ihm für seine direkte Betreuung und Anleitung über all die Jahre zukommen.

Ebenso möchte ich mich besonders bei Frau Fatemeh Promoli für ihre exzellente technische Assistenz und bei Herrn Michael Lauber für seine wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge und Programmiertipps bedanken. Meine Dankbarkeit gilt zudem allen Gruppenmitgliedern der AG Kappler, allerdings besonders meinen wegbegleitenden Doktoranden Ting Jiang, Tamara Löffler, Sebastian Sigl, Qian Li und Marie Bentrop für die tolle Arbeitsatmosphäre, den kreativen Pausen und wissenschaftlichen Anregungen.

Allen voran möchte ich allerdings besonders meiner Familie danken, dass Sie mir die Möglichkeit gaben zu studieren und mich immer bestmöglich unterstützten.