

AUS DER KINDERCHIRURGISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK
IM DR. VON HAUNERSCHEN KINDERSPITAL
KLINIKUM DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROFESSOR DR. MED. OLIVER MUENSTERER

**Charakterisierung therapeutisch und prognostisch relevanter
Faktoren beim Hepatoblastom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Corinna Stefanie Eberherr, geb. Weber

aus

Wasserburg am Inn

2021

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

Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler

Mitberichterstatter:

PD Dr. Stefan Gölder

PD Dr. Barbara Mayer

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

29.11.2021

Eidesstattliche Versicherung

Corinna Stefanie Eberherr, geb. Weber,

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

Charakterisierung therapeutisch und prognostisch relevanter Faktoren beim 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.

Maitenbeth, den 02.12.2021

Corinna Eberherr

Unterschrift (Corinna Eberherr)

„Der Weg ist das Ziel“

(Konfuzius)

Einleitende Zusammenfassung
der schriftlichen, kumulativen Promotion

Gemäß §4a der Promotionsordnung der LMU vom 01. Juni 1983 in der Fassung der
zehnten Änderungssatzung vom 06. Juli 2012

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Publikationen..... | 2 |
| 2. Einleitung | 3 |
| 2.1 Das Hepatoblastom..... | 3 |
| 2.1.1 Epidemiologie..... | 3 |
| 2.1.2 Hepatozelluläre und transitionale Leberzelltumore..... | 3 |
| 2.1.3 Symptome und Diagnose..... | 4 |
| 2.1.4 Histologie | 5 |
| 2.1.5 Staging und molekulare Risikostratifizierung..... | 5 |
| 2.1.5.1 PRETEXT-System | 6 |
| 2.1.5.2 16-Gen-Signatur | 6 |
| 2.1.5.3 4-miR-Signatur | 7 |
| 2.1.6 Genetische Prädisposition..... | 8 |
| 2.1.7 Genetischer und epigenetischer Hintergrund | 9 |
| 2.1.8 Behandlungsstrategien und Outcome | 11 |
| 3. Ziele und Aufgabenstellung der Studien | 13 |
| 3.1 Targeting excessive MYCN expression using MLN8237 and JQ1 impairs the growth of hepatoblastoma cells..... | 13 |
| 3.2 High expression of IGF2-derived intronic miR-483 predicts outcome in hepatoblastoma. | 16 |
| 3.3 Beitrag zu den Publikationen..... | 19 |
| 4. Zusammenfassungen | 20 |
| 4.1. Deutsche Zusammenfassung | 20 |
| 4.2 Summary in English | 22 |
| 5. Abkürzungsverzeichnis | 24 |
| 6. Danksagung | 26 |
| 7. Referenzen..... | 27 |
| 9. Anhang Original Publikationen..... | 34 |

1. Publikationen

Corinna Eberherr, Alexander Beck, Christian Vokuhl, Kristina Becker, Beate Häberle, Dietrich von Schweinitz, Roland Kappler *Targeting excessive MYCN expression using MLN8237 and JQ1 impairs the growth of hepatoblastoma cells*. International journal of oncology 54: 1853-1863, 2019

Jakob Benjamin Wilhelm Weiss, Alexandra Elisabeth Wagner, **Corinna Eberherr**, Beate Häberle, Christian Vokuhl, Dietrich von Schweinitz, Roland Kappler *High expression of IGF2-derived intronic miR-483 predicts outcome in hepatoblastoma*. Cancer biomarkers 28: 321-328, 2020

2. Einleitung

2.1 Das Hepatoblastom

Im Kindes- und Jugendalter sind Tumorerkrankungen sehr selten im Vergleich zu Erwachsenen. Es erkranken im Durchschnitt 2183 Kinder unter 18 Jahren pro Jahr an einer Krebsart. Derzeit überleben 82% der Fälle im Alter von unter 18 Jahren die Krebserkrankung mindestens 15 Jahre [1]. Krebserkrankungen bei Erwachsenen haben ihren Ursprung durch erworbene Mutationen, wohingegen pädiatrische Tumore vermutlich durch Fehler während der Embryonalentwicklung ausgelöst werden [2]. Einer der vorkommenden soliden Tumorarten bei Kindern sind Lebertumore, wobei das Hepatoblastom (HB) am Häufigsten vorkommt. Derzeit ist noch immer Gegenstand von Studien was die Ursachen für die Entstehung von HBs sind. Dabei geht man hauptsächlich davon aus, dass bei der Tumorgenese vor allem entgleiste Entwicklungsprozesse der unreifen hepatischen Vorläuferzellen eine Rolle spielen.

2.1.1 Epidemiologie

Das Hepatoblastom (HB) tritt mit einer Häufigkeit von 1% auf und zählt zu den seltenen malignen Erkrankungen im Kindesalter. Kinder im Alter unter drei Jahren sind am häufigsten betroffen und das HB tritt mit 43% unter den pädiatrischen Lebertumoren am meisten auf [3]. Ein erhöhtes Risiko ein HB zu entwickeln sind Faktoren wie Frühgeburtlichkeit und ein sehr geringes Geburtsgewicht [4-6]. Das HB tritt bei Jungen 1,2-3,3 mal häufiger auf als bei Mädchen [7]. Die Inzidenz für das HB liegt bei etwa 1:1,2 -1,5 Millionen Kindern in den westlichen Ländern, welche jünger als 15 Jahre sind [8, 9].

2.1.2 Hepatozelluläre und transitionale Leberzelltumore

Neben dem HB werden meist bei älteren Kindern oder jungen Erwachsenen sowohl hepatozelluläre Karzinome (HCC) [10] als auch transitionale Leberzelltumore (TLCT) diagnostiziert [11]. Meist entwickeln sich HCCs spontan und unabhängig von bestehenden

Vorerkrankungen der Leber [12]. In einigen Fällen entwickeln sich HCCs bei Kindern, die zuvor an einer chronischen Hepatitis B-Virus Infektion, einer Zirrhose und/oder an zugrunde liegenden metabolischen Stoffwechselerkrankungen erkrankt sind [13, 14]. Das HCC stellt den zweithäufigsten Lebertumor bei Kindern dar und betrifft vor allem Jungen ab einem Alter von 6 Jahren. Die Prognose für kindliche HCCs liegt bei einer Überlebensrate von 25% nach 3 Jahren. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Patienten häufig eine Resistenz gegenüber der Chemotherapie entwickeln und oftmals der Zeitpunkt bei der Diagnosestellung spät ist. Die einzige Heilung in diesen Fällen ist die vollständige operative Entfernung des HCCs [12].

In sehr seltenen Fällen treten TLCTs auf, die sich ebenso bei älteren Kindern manifestieren und eine schlechte Prognose aufweisen. Die TLCTs, welche sich in einem Übergangszustand zwischen dem HB und dem HCC befinden, unterscheiden sich vom HB und HCC bezüglich des klinischen Erscheinungsbilds, der Morphologie, des Immunophänotyps und des Behandlungserfolgs [11].

2.1.3 Symptome und Diagnose

Die Symptome beim HB sind oftmals unspezifisch und die erkrankten HB-Patienten leiden unter allgemeinen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Gewichtsverlust, abdominale Schmerzen, Erschöpfung, Gedeihstörung und Gelbsucht. Die Symptome sind abhängig von der Größe, der Lokalisierung des HB und der Präsenz von Metastasen [15, 16].

Die Diagnosestellung erfolgt in der Regel mittels einer physikalischen Untersuchung, Labordiagnostik und bildgebenden Verfahren wie der Ultraschalluntersuchung, der Computertomographie sowie der Magnetresonanztomographie. Die Patienten mit HB zeigen oftmals eine abdominale Raumforderung, die meist als sichtbare und tastbare aber schmerzlose Schwellung des Bauches auftritt. Anhand der Bildgebung wird sowohl die vollständige Größe des HBs und dessen Ausbreitung als auch das Vorliegen von Metastasen (20%), die überwiegend die Lunge sowie das Gehirn und die Knochen befallen, festgestellt [17, 18]. Zusätzlich werden im Blutbild die Leberwerte und der alpha-Fetoprotein (AFP) Wert zur Sicherung der Diagnose bestimmt. Der AFP-Wert ist zunächst noch zum Zeitpunkt der Geburt stark erhöht und geht allmählich in den ersten 10 Lebenswochen zurück [19]. Normalerweise liegt der AFP-Wert von

Kindern bei 10 ng/ml [20, 21]. Beinahe 70% aller HB Patienten weisen einen erhöhten AFP-Wert von > 500 ng/ml auf, wohingegen der AFP-Wert bei sehr fortgeschrittenen aggressiven kindlichen Lebertumoren geringer sein kann (< 100 ng/ml). Diese Tumoren weisen eine sehr schlechte Prognose auf, da sie sehr resistent gegenüber der Chemotherapie sind [22]. Die Bestimmung des AFP-Levels ist sowohl ein nützvoller diagnostischer Marker für das HB und für das HCC im Kindesalter als auch wichtig zur Risikostratifizierung und zur Einschätzung des Therapieerfolgs. Eine perkutane Biopsie der veränderten Leber als auch der Metastasen ist notwendig für die weitere Risikostratifizierung [7, 16].

2.1.4 Histologie

Das HB ist sehr heterogen mit unterschiedlichen Phänotypen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich um einen embryonalen Tumor handelt. Dieser entwickelt sich aus unreifen hepatischen Vorläuferzellen des Leberparenchyms und repräsentiert somit verschiedene Stadien der Leberentwicklung [23]. Daher kann eine histopathologische Einteilung in den epithelialen (56%) oder den gemischten epithelialen/mesenchymalen Subtyp (44%) erfolgen [9]. Der epitheliale Subtyp wird wiederum untergliedert in den fetalen (31%), den embryonalen (19%), den macrotrabekulären (3%), den kleinzelligen undifferenzierten und cholangioblastischen Typen (3%) [7]. Die mesenchymalen Anteile bestehen meist aus Osteoid, unreifem fibrösem Gewebe und Spindelzellen. Im Allgemeinen ist die Prognose für die Patienten besser, bei denen die Tumore größtenteils aus fetaler Gewebsdifferenzierung bestehen im Vergleich zu den Tumoren aus überwiegend embryonalen oder undifferenzierten kleinzelligen Anteilen [24].

2.1.5 Staging und molekulare Risikostratifizierung

Die Stadieneinteilung des HBs ist unerlässlich für eine korrekte Risikostratifizierung und für die damit verbundene Therapieplanung. Sie umfasst die Lokalisierung und die Ausdehnung des HBs als auch die Beurteilung ob sich bereits Metastasen gebildet haben. Kürzlich haben sich die vier Hauptstudiengruppen, die International childhood liver tumors strategy group (SIOPEL), die Children's Oncology Group (COG), die Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH), und die Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumors (JPTL) zur

Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC) zusammengeschlossen und vertreten nun einen gemeinsamen Ansatz zur Stadieneinteilung und Risikostratifizierung des HBs [25]. Folglich wurden einige prognostisch relevante Merkmale festgelegt.

2.1.5.1 PRETEXT-System

Das PRETEXT-System („pre-treatment extension“) kategorisiert die Tumoren nach ihrer Ausdehnung in der prä-therapeutischen Bildgebung und hat eine hohe prognostische Relevanz. Dabei werden die HBs in vier verschiedene PRETEXT-Gruppen (I-IV) eingeteilt. Dies erfolgt abhängig von der Ausdehnung des Tumors über die vier Sektoren der Leber. Somit ist bei PRETEXT I der Tumor auf einen Sektor der Leber (rechter posteriorer oder linker lateraler Sektor) begrenzt. Bei Stadium II sind zwei aneinandergrenzende Sektoren nicht vom Tumor befallen und bei Stadium III ist nur noch ein Sektor frei von Tumorgewebe. Wohingegen bei PRETEXT IV alle vier Sektoren vom Tumor betroffen sind. Die Tumore, die der Kategorie PRETEXT I-III zugeordnet sind, weisen eine generell bessere Prognose auf im Vergleich zu den sehr fortgeschrittenen PRETEXT IV Tumoren [26].

Es spielen auch noch weitere Kriterien eine Rolle bei der Stadieneinteilung nach PRETEXT. Dazu zählen der Einschluss des Schwanzlappens der Leber (C), das Vorliegen einer extrahepatischen abdominalen Erkrankung (E) und einer Multifokalität des Lebertumors (F), und das Auftreten von Fern- (M) und Lymphknotenmetastasen (N). Zur Stadieneinteilung ist auch die Beurteilung wichtig über das Einwachsen der Tumore in portale (P) oder hepatisch venöse Gefäße (V) und ob eine Tumorraktur (R) vorliegt [27]. Zudem ist für die Einteilung der Patienten in die Hochrisikogruppe das Vorliegen eines sehr geringen AFP-Wertes $< 100\text{ng/ml}$ als auch ein Diagnosealter über 3 Jahre entscheidend [25].

2.1.5.2 16-Gen-Signatur

Neben den klinischen Kriterien für die Stadieneinteilung des HBs spielen neuerdings auch molekulare Marker und Genexpressionssignaturen eine tragende Rolle bei der Stratifizierung.

Cairo et al. haben 2008 eine 16-Gen-Signatur durch eine DNA-Microarray-Analyse identifiziert, die aus je acht Genen für jede Subgruppe besteht. Die 16-Gen-Signatur unterscheidet dabei zwischen den Tumortypen mit günstigerem (Standardrisikogruppe C1) oder aggressiverem Verlauf (Hochrisikogruppe C2) [28]. Die Standardrisikogruppe C1 ist charakterisiert durch eine höhere Differenzierung und meist fetaler Histologie des Tumorgewebes. Die Prognose für die Patienten der C1-Standardrisikogruppe ist im Vergleich zu den Patienten der C2-Hochrisikogruppe deutlich besser. Die Tumore der Hochrisikogruppe C2 sind gekennzeichnet durch eine embryonale Histologie, eine hohe Proliferationsrate, ein fortgeschrittenes Tumorwachstum, ein häufiges Auftreten von vaskulärer Invasion und Bildung von Metastasen [28]. Konsequenterweise zeigen C2 Tumore reduzierte Level für Marker, die charakteristisch sind für reife Hepatozyten wie das Apolipoprotein C4 (*APOC 4*) und die Aldehyd Dehydrogenase 2 Family Member (*ALDH2*). Dafür können erhöhte Expressionswerte für das Alpha Fetoprotein (*AFP*) und Marker, die für das Zellwachstum typisch sind wie der Transkriptionsfaktor E2F5 (*E2F5*) und Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase BUB1 (*BUB1*) nachgewiesen werden [28]. Interessanterweise konnte erst kürzlich die gute Vorhersage des Patienten Outcomes an einer repräsentativen Kohorte bestätigt werden. So zeigte sich, dass C2-Patienten eine schlechte Prognose haben [29].

Die Erforschung und die Anwendung der molekularen Marker wird zukünftig unumgänglich werden für die Verbesserung der Risikostratifizierung und die Optimierung der Behandlungsstrategien im Hinblick auf mögliche zielgerichtete Therapien, insbesondere für die HB-Hochrisikopatienten.

2.1.5.3 4-miR-Signatur

Ebenso gewinnen auch Micro-RNAs (miRs) zunehmend in der onkologischen Prognostik an Relevanz. Cairo et al. haben 2010 die prognostische Rolle der sogenannten 4-miR-Signatur beim HB untersucht [30]. Bei den vier ausgewählten miRs handelt es sich um miR-371, miR-373, miR-100 und let-7a, welche von MYC reguliert werden und zur Tumorgenese des HBs beitragen. Funktionell spielt miR-371 bei der Tumordinvasion, let-7a bei der Differenzierung und als Tumorsuppressor und miR-100 beim mTOR-Signalweg und beim mitotischen Checkpoint eine Rolle. Die Expressionsanalysen von miR-371, miR-373, miR-100 und let-7a zeigten, dass die

HB-Patienten durch die Anwendung der 4-miR-Signatur in die Gruppe mit guten oder schlechten Überlebenschancen (Cm1 oder Cm2) unterteilt werden konnten. Die Cm2-Untergruppe wies kaum differenzierte, invasive und metastasierende Tumore auf mit einer schlechteren Überlebensrate [30]. Somit ist es umso wichtiger weitere miRs als potentielle Biomarker zu identifizieren, um noch effektiver eine Risikostratifizierung vollziehen zu können.

2.1.6 Genetische Prädisposition

Meist treten HB sporadisch auf, dennoch gibt es eine Assoziation mit familiären Krankheitssyndromen wie der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), dem Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS), dem Edward's Syndrom (Trisomie 18) und den Hemihypertrophien [31-34].

FAP-Patienten weisen eine Keimbahnmutation im Adenomatous-polyposis-coli (*APC*) Tumorsuppressorgen auf, die verantwortlich ist für die Polypenbildung im Darm und folglich für die frühe Entstehung des Dickdarmkrebses. Es wurde gezeigt, dass Kinder mit FAP vor allem in den ersten fünf Lebensjahren eine erhöhte Inzidenz von 0.42% für die Entwicklung eines HBs besitzen [33, 35].

Das BWS ist oft mit dem Auftreten embryonaler Tumoren wie dem Wilmstumor, dem Neuroblastom und dem Hepatoblastom verbunden. BWS-Patienten haben ein 2,28-fach höheres Risiko ein HB zu entwickeln im Vergleich zu Gesunden [31, 36]. Beim BWS handelt es sich um ein genetisch bedingtes Großwuchssyndrom, das auf eine Veränderung der genomischen Prägung im Bereich des Chromosoms 11p15.5 zurückzuführen ist, dem Locus des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors 2 (*IGF2*) [32]. Patienten mit BWS weisen normalerweise ein erhöhtes Geburtsgewicht, Fehlbildungen, Makroglossie und vergrößerte abdominale Organe auf.

Zwei weitere Großwuchssyndrome stehen auch in Verbindung mit der Entstehung von HBs, nämlich das Simpson-Golabi-Behemal Syndrom und das Sotos-Syndrom. Diese beiden Syndrome weisen Mutationen oder Deletionen in verschiedenen Genen wie Nuclear Receptor-binding SET domain Protein 1 (*NSD1*) oder Glypican 3 (*GPC3*) auf [37-39].

2.1.7 Genetischer und epigenetischer Hintergrund

Das Hepatoblastom weist die geringste Mutationsrate (2,8 Mutationen pro Tumorgenom) aller Krebsarten auf [40, 41]. Im Allgemeinen weisen Tumore im Kindesalter generell wesentlich weniger Mutationen auf als im Erwachsenenalter [41].

Die bereits sehr frühe Manifestation des HB und die geringe Mutationsrate deuten darauf hin, dass vergleichsweise wenige genetische Veränderungen für die Entstehung des malignen Phänotyps ausreichen [42]. So wurde durch die Exomsequenzierung der HBs aufgezeigt, dass nur wenige Genmutationen vorliegen. Bei zwei Drittel der HB-Fälle ist als einzige wiederkehrende Mutation die des β -Catenin (*CTNNB1*) Gens mit einer Häufigkeit von 72,5% aufgetreten [40, 43]. Zudem wurde nachgewiesen, dass auch häufig Mutationen der Gene *Telomerase Reverse Transkriptase (TERT)* mit einer Mutationsrate von 9,8% und *Nuclear factor-erythroid 2-related Factor 2 (NFE2L2)* mit einer Mutationsrate von 5,9% vorkommen [40].

CTNNB1 codiert für das Protein β -Catenin. Die *CTNNB1*-Mutationen sind meist Punktmutationen oder Deletionen im Exon 3 [44]. Dies führt dazu, dass das CTNNB1 nicht mehr durch den Ubiquitin-proteosomalen-APC/AXIN/GSK3 Weg degradiert werden kann und es im Cytoplasma akkumuliert. Das akkumulierte CTNNB1 wandert in den Zellkern, um dort Zielgene zu aktivieren [45-49]. Dies ist ursächlich für die pathologische Aktivierung des Wnt-Signalweges. Der Wnt-Signalweg spielt normalerweise eine tragende Rolle bei der Organogenese, der Morphologie, der Proliferation, der Differenzierung, der Apoptose, der Zellmotilität und beim Zellüberleben [50, 51]. Zudem hat CTNNB1 eine wichtige Funktion in der Leber und zwar bei der frühen Entwicklung, beim Metabolismus und der Regeneration [50, 51]. Der Wnt-Signalweg kann auch durch somatische Mutationen (<10%) der Gene *APC*, *Axis Inhibition Protein (AXIN1)*, und *AXIN2* bei *CTNNB1*-Wildtyp HB aktiviert werden [52, 53], die dazu führen, dass die Degradierung des CTNNB1 Proteins nicht funktioniert und folglich der Wnt-Signalweg nicht abgeschaltet wird [54]. *AXIN1* und *AXIN2*, deren Proteine mit APC und CTNNB1 interagieren, beeinflussen somit auch den Wnt-Signalweg [53].

TERT ist ein Teil des Telomerase Komplexes [55] und bewirkt in den seneszenten Zellen, dass diese unsterblich werden [56]. Die gefundenen Punktmutationen, welche am *TERT*-Promotor upstream der Transkriptionsstartseite lokalisiert sind, korrelieren mit einer erhöhten *TERT*-

Expression [40]. Aktivierende Transkriptionsfaktoren wie MYC, Adipozytenprotein 2 (AP2) und Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF1) regulieren die *TERT*-Expression und Gene wie *TP53* und *Wilms Tumorprotein (WT1)* werden durch TERT inhibiert [57-60]. Eine erhöhte *TERT*-Expression ist oftmals in Stammzellen und Tumorzellen zu beobachten [57, 61-63].

NFE2L2 ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem für die Aktivierung unterschiedlicher Gene verantwortlich ist, die dem Schutz der Zelle dienen, etwa bei der Abwehr von oxidativem Stress. Die *NFE2L2* Mutationen treten meist im oder nahe den DLG und ETGE Motiven auf, welche für die Bindung des Kelch-like ECH associated Protein 1 (KEAP1) / Cullin 3 (CUL3) Komplexes wichtig sind. Meist führen *NFE2L2* Mutationen bei Tumorzellen dazu, dass NFE2L2 nicht proteosomal degradiert wird [64]. Diese Tumorzellen sind unempfindlicher gegenüber der Chemotherapie, antioxidativem Stress [65-67] und der Bestrahlung [68]. Bei den gefundenen *NFE2L2* Mutationen handelt es sich um Missense-Mutationen [40].

In Einzelfällen wurden auch Mutationen der Gene *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha (PIK3CA)* [69], *Caprin Family Member 2 (CAPRIN2)*, *Kelch-like Protein 22 (KLHL22)*, *Speckle-Typ POZ Protein (SPOP)*, *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member Associated Protein (TRCP4AP)* und *Ring Finger Protein 169 (RNF169)* aufgezeigt [70].

Zudem wurde beim HB eine Überexpression von *Sonic Hedgehog (SHH)*, *GLI Family Zinc Finger 1 (GLI1)*, *Smoothed (SMO)* und *Patched 1 (PTCH1)* [40, 71] und Silencing von *Hedgehog interacting Protein (HHIP)* [40] beobachtet. Dies führt zu einer Deregulation des Hedgehog (HH)-Signalwegs [40]. Ein weiterer wichtiger Signalweg nämlich der IGF2/PI3K/AKT Signalweg ist beim HB auch involviert. Bei der Hochrisikogruppe mit Metastasenbildung und schlechter Prognose wurde eine Überexpression von SP8 und Fibroblasten Wachstumsfaktor 8 (FGF8) nachgewiesen [72].

Häufig treten Hypermethylierungen in den Promoterregionen einiger Tumorsuppressorgene beim HB auf. Dazu gehören Hypermethylierungen der Gene *HHIP*, *Secreted frizzled-related Protein 1 (SFRP1)*, *insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)* und *Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 (RASSF1A)* [71, 73-75]. Im Allgemeinen führt das Silencing dieser Tumorsuppressorgene bedingt durch epigenetische Ereignisse zur Deregulierung

von Signalwegen wie IGF2-, HH- und Wnt-Signalweg. Diese tragen zur Tumorgenese von HBs bei [40, 54, 76].

Der IGF2-Signalweg wird auch durch eine erhöhte *IGF2*-Expression beim HB aktiviert [77, 78]. Der aktivierte IGF2-Signalweg beim HB führt letztlich auch dazu, dass PI3K/AKT und RAS/RAF/MEK/ERK Signalwege induziert werden. Folglich kommt es zu Zellproliferation und einem Anstieg des Zellwachstum beim HB [79, 80].

2.1.8 Behandlungsstrategien und Outcome

Die vollständige chirurgische Entfernung des Tumors ist der entscheidende Schritt bei der kurativen Therapie von HB Patienten. Jedoch kommt eine initiale Resektion des HB nur in sehr seltenen Fällen vor, und zwar bei Vorliegen eines sehr kleinen solitären Tumors (PRETEXT I, gegebenenfalls II). Jahrzehntlang wurden einige Behandlungsschemata des HB in den vier verschiedenen Hauptstudiengruppen durch klinische Studien optimiert [34]. Im Allgemeinen besteht die Therapiestrategie aus einer präoperativen (neoadjuvanten) Chemotherapie, wodurch oftmals eine deutliche Tumorverkleinerung erreicht wird. Anschließend erfolgt eine chirurgische Resektion und eine postoperative (adjuvante) Chemotherapie [16, 81]. Eine Lebertransplantation wird dann in Betracht gezogen, wenn der Tumor nicht chirurgisch entfernbar ist.

Patienten, die nach SIOPEL zur Standardrisikogruppe (PRETEXT I-III) gehören [82], erhalten prä- und postoperativ eine Chemotherapie mit Cisplatin und Doxorubicin [82-84]. Die Patienten der Hochrisikogruppe mit PRETEXT IV und zusätzlichen Vorkommnissen wie Multifokalität (F), vaskuläre Beteiligung (P,V) oder extrahepatischer Invasion (E) erhalten präoperativ Cisplatin abwechselnd mit Carboplatin und Doxorubicin und zum Anderen nach der Tumorentfernung Carboplatin und Doxorubicin im Wechsel mit Cisplatin [85]. Des Weiteren erhält die Hochrisikogruppe mit Fernmetastasen und/oder einem AFP-Wert <100ng/ml [40] als Behandlung Cisplatin und Doxorubicin und einen Zyklus Carboplatin und Doxorubicin vor der operativen Tumorentfernung und einem Zyklus Carboplatin und Doxorubicin postoperativ [82, 86].

Aufgrund der bereits optimierten Therapieansätze hat sich die Überlebensprognose für HB Patienten über die letzten Jahrzehnte deutlich verbessert. So ist die drei Jahresüberlebenschance für Patienten der Standardrisikogruppe auf 95% gestiegen. Die drei Jahresüberlebenschance der Hochrisikogruppe liegt dagegen nur bei 60% [84, 85].

Ein Problem der Chemotherapie stellen die starken Nebenwirkungen dar, mit denen Patienten ein Leben lang zu kämpfen haben. So kann die Chemotherapie zu Haarverlust, Blutergüssen, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhöe, Müdigkeit und einer erhöhten Infektanfälligkeit führen. Die Cisplatintherapie kann durch ihre Oto- und Nephrotoxizität Langzeitfolgen auslösen, die zu teils irreversiblen Organschäden führen können [87, 88]. Die Behandlung mit Doxorubicin birgt das Risiko zum Einen einer akuten Kardiotoxizität und zum Anderen Jahre später Kardiomyopathien zu entwickeln, welche sehr schwer zu therapieren sind und daher eine sehr schlechte Prognose mit sich bringen [89-91]. Weitere mögliche Langzeitschäden sind Sekundärtumore, Unfruchtbarkeit, Wachstumsstörungen, kognitive Beeinträchtigungen und Lungenschäden [82]. Desweiteren ist auch nicht zu vernachlässigen, dass durch die Erkrankung, Behandlung und Klinikaufenthalte auch psychische Probleme hinzukommen wie Depressionen, Auffälligkeiten in sozialen Verhaltensweisen und Lernschwierigkeiten [92, 93]. Ein weiteres Problem stellt die Multidrug-Resistenz dar, die oft nach vier Zyklen Chemotherapie auftritt und somit die weitere Behandlung limitiert [94].

Viele unterschiedliche molekulare Veränderungen wurden nachgewiesen, die zur Entstehung des HBs beitragen. Es ist dennoch von großer Bedeutung weitere molekulare Mechanismen zu identifizieren, die verantwortlich sind für die Manifestation der unterschiedlichen Subtypen des HBs. Aufgrund der sehr starken Nebenwirkungen der Chemotherapie werden vor allem bei Hochrisikopatienten neue Behandlungsstrategien benötigt, die gezielter gegen den Tumor gerichtet sind, um somit sowohl die Überlebenschance dieser Gruppe zu erhöhen als auch die Toxizität zu minimieren.

3. Ziele und Aufgabenstellung der Studien

In der ersten Publikation wird ein neuer gezielter Behandlungsansatz zur Optimierung der bisherigen HB Therapie untersucht. Basierend auf Genexpressionsanalysen hat sich gezeigt, dass das Protoonkogen *MYCN* beim HB, bei anderen pädiatrischen Lebertumoren und bei HB Zelllinien überexprimiert wird und ein vielversprechendes Target darstellt. In der aufgeführten Publikation wurde *in vitro* untersucht, ob die Hemmung der MYCN-Expression durch die beiden MYCN Inhibitoren MLN8237 und JQ1 als potentielle neue zielgerichtete Therapieansätze in Frage kommen.

Die zweite Studie beschäftigt sich mit der Identifizierung weiterer prognostisch relevanter Biomarker auf MicroRNA Ebene. MicroRNAs spielen eine wichtige regulatorische Rolle bei vielen Krebsarten, jedoch sind bisher kaum MicroRNAs bekannt, die beim HB als Biomarker zur Risikostratifizierung dienen könnten. Diese Studie beschäftigt sich mit der Frage, ob die miRNA23b und miR-483 Expression als Biomarker zur Unterscheidung von HB-Hochrisiko-Patienten und Standardrisiko-Patienten anwendbar sind, um deren Therapieoptionen zu verbessern.

3.1 Targeting excessive MYCN expression using MLN8237 and JQ1 impairs the growth of hepatoblastoma cells

Wie oben schon erwähnt ist der Behandlungserfolg von HB-Standardrisikopatienten aufgrund des herkömmlichen Therapiekonzepts sehr gut und liegt bei einer 3-Jahresüberlebensrate von 95%. Der Therapieplan ist abhängig vom Stadium der Erkrankung und besteht meist aus einer pre-operativen Chemotherapie gefolgt von einer chirurgischen Tumorentfernung und einer nachfolgenden post-operativen Chemotherapie. Leider verursacht die Chemotherapie häufig sehr starke Nebenwirkungen und die Hochrisikopatienten zeigen einen schlechten Behandlungserfolg besonders dann wenn das Tumorgewebe sehr großflächig ist, Gefäße infiltriert werden und Metastasen vorliegen. Daher ist es von großer Bedeutung gezielte Behandlungsmöglichkeiten insbesondere für Hochrisikopatienten zu finden, um deren Überlebensrate und Heilungschancen zu erhöhen und die auftretenden Nebenwirkungen durch die Zytostatika zu minimieren.

Dadurch, dass das HB eine auffallend geringe Mutationsrate aufweist, basiert die Identifizierung eines neuen potentiellen Therapieansatzes in dieser Studie auf Genexpressionsanalysen und nicht auf genetischen Ereignissen [40]. So ermöglicht die 16 Gen-Signatur bereits jetzt die Klassifizierung der HBs und die Unterteilung der HB Patienten in die C1-Standardrisikogruppe und C2-Hochrisikogruppe [28]. Ein weiteres Gen, das bei den C1- und C2-Tumorsubtypen eine signifikant unterschiedliche Genexpression aufzeigt, ist *MYCN*. *MYCN* ist ein Protoonkogen, das auf dem Chromosom 2p23-24 lokalisiert ist [95]. Eine erhöhte *MYCN* Genexpression spielt eine entscheidende Rolle bei einigen Tumorarten wie Lungen- und Brustkarzinomen sowie bei bösartigen Erkrankungen neuronalen Ursprungs, nämlich dem Glioblastom, dem Medulloblastom und dem Neuroblastom [96, 97]. So ist die gesteigerte Transkription des Gens *MYCN* beim Neuroblastom hauptsächlich auf die Amplifizierung des *MYCN* Locus zurückzuführen [98]. Im Allgemeinen geht eine erhöhte *MYCN* Expression mit einer gesteigerten Zellproliferation einher, bedingt zum Einen durch die Förderung der Zellzyklusprogression und zum Anderen durch die Hemmung der Apoptose [99]. *MYCN* ist ein Phosphoprotein, das mit MYC associated factor X (MAX) dimerisiert und einen Komplex bildet. Dieser Komplex bindet an regulatorische Regionen von *MYCN* regulierten Genen [100]. *MYCN* stellt ein vielversprechendes Target bei der Behandlung von *MYCN* überexprimierenden HBs dar. Daher liegt der Fokus in dieser Studie auf der Hemmung der *MYCN*-Expression *in vitro* durch die beiden *MYCN* Inhibitoren MLN8237 sowie JQ1 und deren Wirksamkeit.

In dieser Studie konnten wir eine signifikante Erhöhung der *MYCN* Expression bei 47 HBs, 4 TLCTs und 10 HCCs als auch bei vier Lebertumorzelllinien im Vergleich zu normalem Lebergewebe nachweisen. Als nächstes wurde untersucht, ob das antisense Transkript *MYCNOS*, das die *MYCN* Expression bei Rhabdomyosarkomen und Neuroblastomen ebenfalls positiv reguliert [101], im Zusammenhang steht mit der Überexpression von *MYCN* beim HB. Eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität des antisense Transkripts *MYCNOS* konnte in dieser Studie bei pädiatrischen Lebertumoren signifikant gemessen werden und ebenso eine signifikante Korrelation zwischen *MYCN* und *MYCNOS* mRNA Level.

Zudem haben wir gezeigt, dass die beiden Promoterregionen von *MYCN* und *MYCNOS* hypomethyliert sind. Die DNA Methylierung ist ein wichtiger epigenetischer Mechanismus, der die transkriptionelle Aktivität von Genen steuert. So konnten wir nachweisen, dass die DNA-

Methylierung negativ korreliert mit der Genexpression von *MYCN* und *MYCNOS* und somit die Hypomethylierung von *MYCN* und *MYCNOS* zur veränderten Expression beiträgt.

Als nächstes beschäftigen uns die Frage, ob die Überexpression von *MYCN* auch das Zellwachstum bei HB-Zelllinien beeinflusst. Als Resultat eines transienten *MYCN* knock downs konnten wir eine Abnahme der Zellvitalität beobachten. Aufgrund dessen untersuchten wir im nächsten Schritt die Effekte der beiden *MYCN* Inhibitoren MLN8237 und JQ1 bezüglich des Lebertumorzellwachstums und deren Potential als möglicher neuer Therapieansatz. Das Molekül MLN8237 ist daran beteiligt, die Bildung des Aurora-A/*MYCN* Komplex zu verhindern, wodurch die Degradierung des *MYCN* Proteins durch die FBX7-Ubiquitin Ligase gefördert wird [102]. Bei JQ1 handelt es sich um einen BET Bromodomain Inhibitor, der die BRD4 Domäne des *MYCN* Promoters verdrängt und somit eine stark hemmende Wirkung auf die *MYCN*-Transkription ausübt [103]. Die Behandlung von *MYCN* überexprimierenden HB-Zelllinien mit MLN8237 und JQ1 bewirkte eine signifikante Erniedrigung von *MYCN* sowohl auf RNA- als auch Proteinebene. Bei Anwendung der beiden *MYCN* Inhibitoren konnten wir bei den Lebertumorzellen mit hohem *MYCN* mRNA Level einen starken dosisabhängigen Zellwachstumsarrest detektieren. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die behandelten Tumorzelllinien entweder in der G1/G0 nach JQ1 oder in der G2 Phase nach MLN8237 Behandlung verbleiben. Des Weiteren verursachte MLN8237 Spindelstörungen und Apoptose bei den Tumorzellen. Dies ist übereinstimmend mit dem beobachteten G2 Arrest und das Anschwellen der Lebertumorzellen nach der Behandlung mit MLN8237. Ebenso führte auch JQ1 zur Apoptose der HB-Zellen.

Zusammenfassend stellt *MYCN* ein mögliches therapeutisches Ziel bei *MYCN* überexprimierenden Tumoren dar. Beide *MYCN*-Inhibitoren könnten als neue potentielle zielgerichtete Therapieoptionen bei der Behandlung von HB-Patienten in Frage kommen. So haben Studien bei anderen soliden Krebsarten gezeigt, dass die Kombination aus einer Cisplatin und entweder JQ1 oder MLN8237 Therapie synergistische Effekte aufweist [104, 105]. Diesbezüglich könnten besonders Patienten der Hochrisikogruppe von der zielgerichteten Therapie profitieren, bei denen die Kombination aus Cisplatin und Doxorubicin zu schweren Nebenwirkungen führt [16, 91, 106].

3.2 High expression of IGF2-derived intronic miR-483 predicts outcome in hepatoblastoma

MicroRNAs (miRs) spielen eine wichtige regulatorische Rolle bei verschiedenen Krebserkrankungen, da nachgewiesen wurde, dass diese als Onkogene [107, 108] oder als Tumorsuppressoren agieren können [109].

In dieser Studie haben wir die klinische Relevanz der bereits beschriebenen 4-miR-Signatur bei einer unabhängigen Kohorte von HB-Patienten untersucht [30]. Ergänzend dazu wurde die prognostische Rolle der miR23b und miR483 Expression genauer betrachtet, um zusätzliche Biomarker zu finden und somit die Risikostratifizierung zu optimieren.

MiRs werden bereits als therapeutische und diagnostische Werkzeuge in der Onkologie verwendet [110]. So haben Tong et al. eine 16-miR-Signatur identifiziert, mit Hilfe derer die Rückfallquote bei Prostatakrebs besser vorhersagbar ist [111]. Zudem können Clusteranalysen zirkulierender miRs bereits beim Prostatakrebs zur Rezidivprognose genutzt werden [112]. Es wurde auch beschrieben, dass Clusteranalysen zirkulierender miRs dazu dienen, das Risiko für das Auftreten eines HCCs bei zirrhotischen Patienten [113] oder das Risiko für das Fortschreiten der Krankheit bei Patienten mit chronischer Hepatitis-B abzuschätzen [114]. Zhang et al. haben eine 3-miR Signatur etabliert, die es ermöglicht HCC-Patienten im Frühstadium und mit geringen AFP-Werten zu identifizieren [115]. Wie schon oben erwähnt hat die Studiengruppe Cairo et al. mit Hilfe der 16-Gen-Signatur die HB-Patienten in die C1-Standardrisikogruppe und die C2-Hochrisikogruppe unterteilen können [28]. Darüber hinaus konnten sie 2010 auch zeigen, dass das Outcome der HB-Patienten durch die Anwendung der 4-miR Signatur bestimmt werden kann [30]. Dazu wurde die Expression von miR-371, miR-373, miR-100 und let-7a bei HB-Patienten untersucht. Alle 4 miRs werden von MYC reguliert, das zur Tumorgenese vom HB beiträgt. Cairo et al. zeigten, dass anhand der miR-Expressionsanalyse die Patienten in die Gruppe mit guten oder schlechten Überlebenschancen (Cm1 oder Cm2) unterschieden werden können. Bei den Cm2 HBs handelt sich dabei um sehr undifferenzierte, invasive und metastasierende Tumore [30]. Neben den genannten miRs existieren aktuell noch sehr wenige Daten über weitere prognostisch relevante miRs.

Die von uns analysierten 29 HB-Proben konnten nach der 16-Gen-Signatur von Cairo et al. [28] entweder der C1 Standardrisikogruppe oder der C2 Hochrisikogruppe zugeordnet werden. Für die

Evaluierung der bereits beschriebenen 4-miR-Signatur [28, 30] haben wir ebenfalls bei 29 HB-Proben und 10 NL-Proben eine Expressionsanalyse der miR-371, miR-373, miR-100 und miR-let-7a durchgeführt. Anhand dieser konnten wir die HBs in die zwei Gruppen Cm1 oder Cm 2 unterteilen [30]. Anders als von der Studiengruppe Cairo et al. beobachtet [30], haben wir jedoch keinen Unterschied bezüglich der Überlebensrate bei unserer Cm1 oder Cm2 Patientengruppe nachweisen können. Es zeigte sich auch kein Zusammenhang zwischen der Cm1 oder Cm2 Gruppe und den klinisch-pathologischen Risikofaktoren wie das Diagnosealter > 5 Jahre, Gefäßinvasion, gemischte oder überwiegend fetale Histologie, PRETEXT IV, extrahepatisches, metastatisches und multifokales Wachstum. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass nur miR-373 sowie miR-371 bei den HBs im Vergleich zum NL signifikant hochreguliert waren und wir keinen Unterschied in der miR100- als auch let-7a Expression zwischen HBs und NL messen konnten. Zusammenfassend ist es in diesem Fall nicht möglich, die 4-miR-Signatur als verlässlichen prognostischen Marker bei den 29 HB Patienten zu bestätigen.

Als Nächstes untersuchten wir weitere miRs auf ihre prognostische Rolle beim HB und zwar die der miR-23b als auch miR-483. Da die Funktion dieser beiden miRs beim HB noch nicht vollständig geklärt ist, untersuchten wir sowohl die Expression des 5´ Transkripts (-5p) als auch des 3´Transkripts (3-p). MiR-23b ist ebenso ein Target von MYC und gilt als Tumorsuppressor bei verschiedenen Krebsarten [116, 117]. MiR-23b hat als potentieller prognostischer Biomarker bei HCCs bereits eine große Bedeutung. So hat sich gezeigt, dass erniedrigte miR-23b-3p- Werte verbunden sind mit Metastasierung, vaskulärer Infiltration und einer geringeren Überlebensrate im Vergleich zu Patienten mit höheren Expressionsraten [118]. In einer vorhergehenden Studie zeigten Cairo et al. bereits, dass miR-23b koreguliert wird von let7-a und miR-100 und die Expressionsrate beim HB reduziert war [30]. In unserer Studie konnten wir jedoch keinerlei signifikanten Unterschied bezüglich der miR-23b Expression beider Transkripte beim HB im Vergleich zum NL nachweisen. Ebenso ergab sich keine Korrelation zwischen der Expression und klinischer Parameter. Somit tragen die zur 4-miR-Signatur ergänzenden miR-23b-5p und miR-23b-3p Expressionsmessungen nicht zu einer Verbesserung der Risikostratifizierung als auch nicht zu einer Unterteilung der Patientengruppen bei.

Zudem untersuchten wir als mögliche weitere Biomarker die beiden Transkripte 5´ und 3´ der miR-483. MiR-483 ist bereits als Onkogen bei einigen Krebsarten wie beim Wilms Tumor und auch beim Leberkrebs bekannt [119]. Es wurde bereits für das HCC *in vitro* beschrieben, dass

eine signifikante Erhöhung von miR-483-5p mit einem schnellerem Auftreten eines Rezidivs und fortgeschrittener Invasivität als auch Bildung von Metastasen verbunden ist, bedingt durch die Herunterregulierung des aktivierten Leukozyten- Zelladhäsionsmoleküls [120]. Ebenso konnten Ma et al. ähnliche Ergebnisse feststellen. Diese zeigten einen positiven Zusammenhang bezüglich der Proliferation der murinen HCC Zellen durch die Herunterregulierung des Suppressors des Cytokin-Signalwegs 3 [121]. Nennenswert ist auch, dass miR-483 auf dem Chromosom 11p15.5 im zweiten Intron des *IGF2* Gens lokalisiert ist und somit in einigen Krankheitsbildern involviert ist [119, 121-123]. Des Weiteren wurde bei einigen Tumorarten der Zusammenhang zwischen der erhöhten miR-483 Expression und der Ko-Regulation des IGF2 sowie der β -Catenin induzierten Transkription dargestellt [124]. Wie oben bereits erwähnt wird auch IGF2 beim HB überexprimiert und es treten β -Catenin-Mutationen auf, die zur Akkumulierung von β -Catenin führen und hauptverantwortlich sind für die Entstehung als auch für die Progression des HBs [40, 54, 77, 125].

In dieser Studie konnten wir beim HB verglichen mit NL erhöhte Expressionslevel von miR-483, vor allem des 5'-Transkripts, nachweisen. Zudem hat sich deutlich gezeigt, dass die erhöhte Expression von miR-483 sehr stark mit dem bekannten Risikofaktor PRETEXT IV-Stadium beim HB korreliert [126]. Die Kombination der miR-483 Expression mit der 4-miR-Signatur stellt einen weiteren Biomarker dar, der HBs mit schlechtem Outcome und einhergehend mit großem, gefäßinvasivem Tumorwachstum effektiver prognostizieren lässt.

Alles in Einem stellt die Erweiterung der 4miR-Signatur um die miR483 Expression einen potentiellen neuen Biomarker dar, um die Überlebensrate der HB-Patienten besser zu beurteilen. Die neue 6-miR- Signatur trägt zu einer Optimierung der Risikostratifizierung bei Hochrisikopatienten bzgl. invasives Gefäßwachstum, PRETEXT Stadium und Outcome bei.

3.3 Beitrag zu den Publikationen

Für die Publikation *``Targeting excessive MYCN expression using MLN8237 and JQ1 impairs the growth of hepatoblastoma cells``* wurden die Versuchsplanung und die experimentellen Laborarbeiten von der Doktorandin Corinna Eberherr selbstständig vollzogen, mit Ausnahme der immunohistologischen Färbung. Die Ergebnisse und Datensätze wurden von der Doktorandin Corinna Eberherr generiert, analysiert und interpretiert. Die Datensätze wurden von der Doktorandin Corinna Eberherr statistisch ausgewertet und in Form von Graphiken dargestellt. Zudem hat die Doktorandin Corinna Eberherr bei der Erstellung des Manuskripts mitgewirkt.

Zur Publikation *``High expression of IGF2-derived intronic miR-483 predicts outcome in hepatoblastoma``* hat die Doktorandin Corinna Eberherr die TaqMan®Gene expression assays und die Versuchsplanung als auch die Auswertung der Ergebnisse etabliert und durchgeführt. Zudem war die Doktorandin Corinna Eberherr bei der Erstellung des Manuskripts und der Graphiken beteiligt.

4. Zusammenfassungen

4.1. Deutsche Zusammenfassung

Lebertumore treten sehr selten im Kindesalter auf wobei das Hepatoblastom die häufigste maligne Lebertumorart darstellt und meist in den ersten drei Lebensjahren diagnostiziert wird. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Tumorgenese dieses sehr früh auftretenden embryonalen Tumors nicht alleine auf die wenigen genetischen Veränderungen zurückzuführen ist. Vielmehr scheinen epigenetische Modifikationen und eine veränderte Expression verschiedener Gene entscheidend zur Tumorentstehung beizutragen. Die Standardtherapie beim HB hat zum Ziel durch die pre-operative Chemotherapie den Tumor so zu verkleinern, dass er operabel ist, um ihn chirurgisch und mit einer nachfolgenden Chemotherapie vollständig zu entfernen. Dieser Therapieansatz zeigt einen sehr guten Behandlungserfolg und erzielt eine 3-Jahresüberlebensrate von über 95% bei den Standardrisiko-Patienten. Unglücklicherweise, sprechen die Hochrisiko-Patienten auf die herkömmliche Therapie meist weniger erfolgreich an und haben nach wie vor eine leider schlechte Prognose. Zudem können die angewendeten Chemotherapeutika schwere Nebenwirkungen und irreversible Organschäden verursachen.

Das Thema dieser Doktorarbeit war es das Onkogen MYCN als mögliches neues therapeutisches Target zu identifizieren bei pädiatrischen Lebertumoren. In diesem Zusammenhang wurde *in vitro* die Wirksamkeit der beiden MYCN Inhibitoren MLN8237 und JQ1 bei MYCN überexprimierenden pädiatrischen Lebertumorzellen als potentiell neue zielgerichtete Therapieansätze untersucht. Desweiteren haben wir unseren Fokus darauf gelegt, ob die miRNA23B- und miR483-Expression als neuer möglicher Biomarker die Risikostratifizierung bei HB-Patienten erlaubt.

Genexpressionanalysen haben gezeigt, dass das Onkogen MYCN beim HB als auch bei pädiatrischen TLCTs und HCCs überexprimiert wird. Dies ist auf eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität des antisense Transkripts MYCNOS zurückzuführen. Aufgrund der von uns nachgewiesenen Hypomethylierungen in den Promoterregionen von MYCN und MYCNOS trägt vermutlich ein epigenetischer Mechanismus zur veränderten MYCN sowie MYCNOS Expression bei. Daher stellt MYCN ein vielversprechendes Target für MYCN überexprimierende

Tumore dar. Als Resultat eines transienten *MYCN* knock downs in den pädiatrischen Lebertumorzelllinien konnten wir eine Abnahme der Zellvitalität beobachten. Daher fokussierten wir uns darauf ob die *MYCN* Inhibitoren MLN8237 und JQ1 einen inhibierenden Effekt auf das Zellwachstum der pädiatrischen Lebertumorzelllinien haben. Die beiden *MYCN* Inhibitoren MLN8237 und JQ1 führten zu einer signifikanten Reduzierung von *MYCN* entweder auf RNA- oder auf Proteinebene bei den behandelten pädiatrischen Lebertumorzelllinien. Die Behandlung der pädiatrischen Lebertumorzellen mit MLN837 und JQ1 bewirkte eine Dosis abhängige Hemmung des Lebertumorzellwachstums, bei gleichzeitiger Induktion der Apoptose. Während MLN8237 Spindelstörungen und einen damit assoziierten G2 Arrest auslöste, führte JQ1 zu einem G1/G0 Arrest. Zusammenfassend stellt die Inhibierung von *MYCN* bei Patienten mit *MYCN* überexprimierenden Tumoren eine vielversprechende Therapieoption dar, insbesondere bei Hochrisiko-Patienten.

Die zweite Studie beschäftigt sich mit der Identifizierung eines prognostisch relevanten Biomarkers des Hepatoblastoms auf MicroRNA-Ebene. Dabei haben wir uns darauf fokussiert, die klinische Relevanz der bereits beschriebenen 4-miR-Signatur bestehend aus miR-371, miR-373 miR-100 und let-7a bei einer unabhängigen Kohorte von HB-Patienten nochmals nachzuweisen. Zudem haben wir untersucht, ob die prognostische Relevanz von miRs optimiert werden kann. Dazu haben wir die bereits bestehende 4-miR-Signatur durch vier weitere miRs nämlich miR-23b-5p, miR-23b-3p, miR-483-5p und miR-483-3p, welche eine biologische Rolle beim HB spielen, ergänzt. Daraus ergab sich, dass wir durch die Verwendung der 4-miR-Signatur keinen Zusammenhang zu klinischen Parametern bei unserer unabhängigen HB-Patientenkohorte und auch keinen Effekt auf die Vorhersage des Outcomes dieser Patientengruppe nachweisen konnten. Auch die miR-23 Expression spielt keine Rolle bzgl. der Risikostratifizierung und trägt daher auch nicht zur Optimierung der Unterteilung der Patientengruppen bei. Allerdings zeigte sich, dass die Erweiterung der 4miR-Signatur, um die miR-483 Expression beider Transkripte, die Vorhersage der Überlebensrate der beiden Patientengruppen Cm1 und Cm2 signifikant gesteigert hat. Des Weiteren haben wir festgestellt, dass die neue 6-miR-Signatur zur Verbesserung der Risikostratifizierung bei Hochrisikopatienten beiträgt bzgl. Outcome, PRETEXT Stadium und invasives Gefäßwachstum. Insgesamt stellt die neu beschriebene 6-miR-Signatur bestehend aus miR-371, miR-373 miR-100 and let-7a, miR-483-5p and miR483-3p einen neuen potentiellen Biomarker dar, um die Prognose und das Outcome von HB-Patienten

vorherzusagen. Jedoch ist es notwendig, die Studie mit einer größeren Patientenkohorte weiterzuführen.

4.2 Summary in English

Liver cancer is a rare disease in childhood and the most frequent type is hepatoblastoma (HB) mainly diagnosed at the first three years of life. Actually the tumor genesis of this pediatric liver malignancy is not only generated by genetic changes. Rather, epigenetic events and aberrant gene expression make a decisive contribution to tumor development. At the moment the standard treatment of HB is used to reduce tumor mass by pre-operative chemotherapy and complete elimination of the cancer by surgical removal and followed chemotherapy. The existing therapy strategy results in a very good treatment success with a three-year overall survival rate of 95% for the standard risk group. Unfortunately, the prognosis for high-risk patients is poor due to limited effects of the chemotherapy. Additionally, the applied chemotherapy in HB treatment is able to affect adverse events leading to serious organ damage.

The topic of this dissertation was to identify a novel targeted therapy option in pediatric liver tumors based on the oncogene *MYCN*. In this context we examined the effect of two *MYCN* inhibitors MLN8237 and JQ1 for *MYCN* overexpressing pediatric liver cancer cell lines. In addition, our interest also was to elucidate if measurement of miRNA23B-expression and miR-483 expression could be used as new potential biomarker for early risk stratification of HB patients.

Here, we show the oncogene *MYCN* to be generally upregulated in HB as well as in pediatric TLCT and HCC due to transcriptional activity of its antisense transcript *MYCNOS*. We found the promoter regions of both *MYCN* and *MYCNOS* to be hypomethylated, suggesting an epigenetic mechanism by which their aberrant expression is induced. Therefore, *MYCN* is a potential target for *MYCN* overexpressing pediatric liver tumors. We observed that liver cancer cell lines showed a reduction of cell viability after transient knock down of *MYCN*. Thus, our interest was focused on the effects of *MYCN* inhibitors namely MLN8237 and JQ1 regarding growth inhibition of pediatric liver cancer cell lines. We showed that treatment of pediatric liver cancer cell lines by both *MYCN* inhibitors MLN8237 and JQ1 caused significant reduction of *MYCN* either at RNA

or protein level. In Addition MLN8237 and JQ1 induce dose-dependent reduction of cell viability and trigger apoptosis. MLN8237 treated liver cancer cell lines indicate spindle disturbances and G2 arrest, whereas JQ1 is able to cause G1/G0 arrest. Our findings suggest MYCN as a promising target for HB and the two MYCN inhibitors MLN8237 and JQ1 as a potent auspicious therapy strategy in patients with *MYCN* overexpressing tumors. Especially high risk patients with poor outcome might benefit from this targeted therapy treatment.

MicroRNAs have emerged as important regulatory players in various cancers. Their role as biomarker to predict outcome in HB has still to be determined. In this present study, we examined the clinical relevance of the described four-miR signature consisting of miR-371, miR-373 miR-100 and let-7a in an independent cohort of HB patients. In addition we focused our interest on the prognostic role of further miRs engaged in HB and that is miR-23b-5p, miR-23b-3p, miR-483-5p and miR483-3p. The recently described four-miR signature was used for risk stratification of HB patients concerning their prognosis. Using the four-miR signature for risk stratification showed no correlation between clinical risk parameters and patient outcome in our independent cohort of HB patients. Furthermore, adding the miR-23b-5p and miR23b-3p expression to the existing four-miR signature has also no potential to optimize the discriminating power because there is no link to any clinical parameter. However, we could reveal the two distinct groups Cm1 and Cm2 with significantly different overall survival by integration both variants of miR-483 into the four-miR signature. Additionally, we investigated the association of the new 6miR-signature with any clinical risk factor. As a result, we found that Cm2 high risk patients have a poor outcome affiliated to extensive tumor growth (PRETEXT IV) and vascular infiltration. In conclusion, the new described 6-miR-signature consisting of miR-371, miR-373 miR-100 and let-7a, miR-483-5p and miR483-3p is usable as new potential biomarker for prognosis and outcome of HB patients. However, further investigation in a larger patient cohort is required.

5. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|----------------------------------------------------------|
| AFP | alpha Fetoprotein |
| ALDH2 | Aldehyd Dehydrogenase 2 Family Member |
| AP2 | Adipozytenprotein 2 |
| APC | Adenomatous-polyposis-coli |
| APOC4 | Apolipoprotein C4 |
| AXIN | Axis Inhibition Protein |
| BUB1 | Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase BUB1 |
| BWS | Beckwith-Wiedemann Syndrom |
| CAPRIN2 | Caprin Family Member 2 |
| CHIC | Children's Hepatic tumors International Collaboration |
| COG | Children's Oncology Group |
| CTNNB1 | β-Catenin |
| CUL3 | Cullin 3 |
| E2F5 | Transkriptionsfaktor E2F5 |
| FAP | Familiäre adenomatöse Polyposis |
| FGF8 | Fibroblasten Wachstumsfaktor 8 |
| GLI1 | GLI Family Zinc Finger 1 |
| GPC3 | Glypican 3 |
| GPOH | Deutsche Gesellschaft für Onkologie und Hämatologie |
| HB | Hepatoblastom |
| HCC | Hepatozelluläres Karzinom |
| HIF1 | Hypoxie-induzierter Faktor 1 |
| HHIP | hedgehog interacting protein |
| IGF2 | Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 2 |
| IGFBP3 | Insulin-like growth factor binding protein 3 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| JPTL | Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumors |
| KEAP1 | Kelch-like ECH associated Protein 1 |
| KLHL22 | Kelch-like Protein 22 |
| LOH | Verlust der Heterozygotie |
| MAX | myc-associated factor |
| miRs | MicroRNAs |
| NFE2L2 | Nuclear factor-erythroid 2-related Factor 2 |
| NSD1 | Nuclear Receptor-binding SET domain Protein 1 |
| PIK3CA | Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate3-Kinase Catalytic Subunit Alpha |
| PRETEXT | pre-treatment extension |
| PTCH1 | Patched 1 |
| RASSF1 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 |
| RNF169 | Ring Finger Protein 169 |
| SFRP1 | secreted frizzled-related protein 1 |
| SHH | Sonic Hedgehog |
| SIOPEL | International childhood liver tumors strategy group |
| SMO | Smoothened |
| SPOP | Speckle-Typ POZ Protein |
| TERT | Telomerase reverse Transkriptase |
| TLCT | transitionaler Leberzelltumor |
| TRPC4AP | Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 4 Associated Protein |
| WT1 | Wilms Tumorprotein |

6. Danksagung

Herzlichen Dank geht an Prof. Dr. med. Dietrich Schweinitz, ehemaliger Direktor der Haunerschen Kinderchirurgie, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben an der Kinderchirurgischen Klinik die Promotion durchzuführen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler, der mir die ganzen Jahre immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für die unermüdliche und großartige Unterstützung bei meinem Forschungsprojekt und bei der Veröffentlichung meiner Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an die außerordentliche und unkomplizierte Zusammenarbeit mit Dr. med. Alexander Beck. Ein ganz spezieller Dank geht an meine Labornachbarin und ebenfalls PhD-Studentin Agnes Garnier, mit dir habe ich sehr viele bereichernde Diskussionen geführt und du hast mir sehr viel weitergeholfen auf labortechnischer, wissenschaftlicher und freundschaftlicher Ebene. Auch möchte ich ein großes Dankeschön sagen zu allen Mitgliedern des Labors Agnes Garnier, Iva Mikulic, Björn Krietemeyer, Jakob Mühling, Tatjana Schmid, Alexander Beck, Franziska Trippel, Tamara Krause und an unsere Laborseele Shiva Promoli. Danke für eure tatkräftige Unterstützung, eure Herzlichkeit und die gemeinsame großartige Zeit.

Sehr großer Dank geht an meine Eltern Anni und Günter Weber, die mir es erst ermöglicht haben diesen Weg zu gehen. Ich konnte mich immer auf euch verlassen und habe die beste Unterstützung erfahren. Ebenso möchte ich mich bei meinen Schwiegereltern bedanken, die oftmals auf meine Töchter Leonie und Miriam aufgepasst haben und mir somit zusätzlich Freiraum zur schriftlichen Anfertigung der Doktorarbeit gegeben haben. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Mann Christian bedanken, der mir zu jeder Zeit den Rücken freigehalten hat und mich immer darin bestärkt hat weiterzumachen. Besonderer Dank geht an meine Töchter Leonie und Miriam, die mein Leben so sehr Tag für Tag bereichern.

7. Referenzen

1. Erdmann F KP, Grabow D, Spix C: **German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018)**. In. Edited by Institute of Medical Biostatistics EaIIatUMCotJGUM; 2020.
2. Stiller CA: **Epidemiology and genetics of childhood cancer**. *Oncogene* 2004, **23**(38):6429-6444.
3. Weinberg AG, Finegold MJ: **Primary hepatic tumors of childhood**. *Hum Pathol* 1983, **14**(6):512-537.
4. Ross JA: **Hepatoblastoma and birth weight: too little, too big, or just right?** *J Pediatr* 1997, **130**(4):516-517.
5. Spector LG, Feusner JH, Ross JA: **Hepatoblastoma and low birth weight**. *Pediatr Blood Cancer* 2004, **43**(6):706.
6. Ikeda H, Nakamura Y: **Trends in incidence of childhood malignant solid tumors in Japan: Estimation based on hospital-based registration**. *J Pediatr Surg* 2015, **50**(9):1506-1512.
7. Herzog CE, Andrassy RJ, Eftekhari F: **Childhood cancers: hepatoblastoma**. *Oncologist* 2000, **5**(6):445-453.
8. Litten JB, Tomlinson GE: **Liver tumors in children**. *Oncologist* 2008, **13**(7):812-820.
9. Aronson DC, Czauderna P, Maibach R, Perilongo G, Morland B: **The treatment of hepatoblastoma: Its evolution and the current status as per the SIOPEL trials**. *J Indian Assoc Pediatr Surg* 2014, **19**(4):201-207.
10. Meyers RL: **Tumors of the liver in children**. *Surg Oncol* 2007, **16**(3):195-203.
11. Prokurat A, Kluge P, Kosciesza A, Perek D, Kappeler A, Zimmermann A: **Transitional liver cell tumors (TLCT) in older children and adolescents: a novel group of aggressive hepatic tumors expressing beta-catenin**. *Med Pediatr Oncol* 2002, **39**(5):510-518.
12. Czauderna P, Mackinlay G, Perilongo G, Brown J, Shafford E, Aronson D, Pritchard J, Chapchap P, Keeling J, Plaschkes J *et al*: **Hepatocellular carcinoma in children: results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology group**. *J Clin Oncol* 2002, **20**(12):2798-2804.
13. Chang MH: **Hepatocellular carcinoma in children**. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi* 1998, **39**(6):366-370.
14. Yu SB, Kim HY, Eo H, Won JK, Jung SE, Park KW, Kim WK: **Clinical characteristics and prognosis of pediatric hepatocellular carcinoma**. *World J Surg* 2006, **30**(1):43-50.
15. Fernandez-Pineda I, Cabello-Laureano R: **Differential diagnosis and management of liver tumors in infants**. *World J Hepatol* 2014, **6**(7):486-495.
16. Hiyama E: **Pediatric hepatoblastoma: diagnosis and treatment**. *Transl Pediatr* 2014, **3**(4):293-299.
17. Perilongo G, Brown J, Shafford E, Brock P, De Camargo B, Keeling JW, Vos A, Philips A, Pritchard J, Plaschkes J: **Hepatoblastoma presenting with lung metastases: treatment results of the first cooperative, prospective study of the International Society of Paediatric Oncology on childhood liver tumors**. *Cancer* 2000, **89**(8):1845-1853.
18. Perilongo G, Shafford E, Plaschkes J, Liver Tumour Study Group of the International Society of Paediatric O: **SIOPEL trials using preoperative chemotherapy in hepatoblastoma**. *Lancet Oncol* 2000, **1**:94-100.
19. Calaminus G, Vesterling-Horner D, Bokkerink JP, Gadner H, Gunther G, Haas HJ, 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):246-250.

REFERENZEN

20. Tsuchida Y, Endo Y, Saito S, Kaneko M, Shiraki K, Ohmi K: **Evaluation of alpha-fetoprotein in early infancy.** *J Pediatr Surg* 1978, **13**(2):155-162.
21. Wu JT, Book L, Sudar K: **Serum alpha fetoprotein (AFP) levels in normal infants.** *Pediatr Res* 1981, **15**(1):50-52.
22. De Ioris M, Brugieres L, Zimmermann A, Keeling J, Brock P, Maibach R, Pritchard J, Shafford L, Zsiros J, Czauderna P *et al*: **Hepatoblastoma with a low serum alpha-fetoprotein level at diagnosis: the SIOPEL group experience.** *Eur J Cancer* 2008, **44**(4):545-550.
23. Lopez-Terrada D, Alaggio R, de Davila MT, Czauderna P, Hiyama E, Katzenstein H, Leuschner I, Malogolowkin M, Meyers R, Ranganathan S *et al*: **Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium.** *Mod Pathol* 2014, **27**(3):472-491.
24. Trobaugh-Lotrario AD, Tomlinson GE, Finegold MJ, Gore L, Feusner JH: **Small cell undifferentiated variant of hepatoblastoma: adverse clinical and molecular features similar to rhabdoid tumors.** *Pediatr Blood Cancer* 2009, **52**(3):328-334.
25. Meyers RL, Maibach R, Hiyama E, Haberle B, Krailo M, Rangaswami A, Aronson DC, Malogolowkin MH, Perilongo G, von Schweinitz D *et al*: **Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration.** *Lancet Oncol* 2017, **18**(1):122-131.
26. Aronson DC, Schnater JM, Staalman CR, Weverling GJ, Plaschkes J, Perilongo G, Brown J, Phillips A, Otte JB, Czauderna P *et al*: **Predictive value of the pretreatment extent of disease system in hepatoblastoma: results from the International Society of Pediatric Oncology Liver Tumor Study Group SIOPEL-1 study.** *J Clin Oncol* 2005, **23**(6):1245-1252.
27. Towbin AJ, Meyers RL, Woodley H, Miyazaki O, Weldon CB, Morland B, Hiyama E, Czauderna P, Roebuck DJ, Tiao GM: **Another point of view on 2017 PRETEXT: reply to Pariente et al.** *Pediatr Radiol* 2018, **48**(12):1820-1822.
28. Cairo S, Armengol C, De Reynies A, Wei Y, Thomas E, Renard CA, Goga A, Balakrishnan A, Semeraro M, Gresh L *et al*: **Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer.** *Cancer Cell* 2008, **14**(6):471-484.
29. Cairo S, Armengol C, Maibach R, Haberle B, Becker K, Carrillo-Reixach J, Guettier C, Vokuhl C, Schmid I, Buendia MA *et al*: **A combined clinical and biological risk classification improves prediction of outcome in hepatoblastoma patients.** *Eur J Cancer* 2020, **141**:30-39.
30. Cairo S, Wang Y, de Reynies A, Duroure K, Dahan J, Redon MJ, Fabre M, McClelland M, Wang XW, Croce CM *et al*: **Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(47):20471-20476.
31. DeBaun MR, Tucker MA: **Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry.** *J Pediatr* 1998, **132**(3 Pt 1):398-400.
32. 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).** *J Pediatr* 2004, **145**(6):796-799.
33. Hughes LJ, Michels VV: **Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis.** *Am J Med Genet* 1992, **43**(6):1023-1025.
34. Czauderna P, Lopez-Terrada D, Hiyama E, Haberle B, Malogolowkin MH, Meyers RL: **Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy.** *Curr Opin Pediatr* 2014, **26**(1):19-28.
35. Kingston JE, Draper GJ, Mann JR: **Hepatoblastoma and polyposis coli.** *Lancet* 1982, **1**(8269):457.
36. Buckley JD, Sather H, Ruccione K, Rogers PC, Haas JE, Henderson BE, Hammond GD: **A case-control study of risk factors for hepatoblastoma. A report from the Childrens Cancer Study Group.** *Cancer* 1989, **64**(5):1169-1176.
37. Kato M, Takita J, Takahashi K, Mimaki M, Chen Y, Koh K, Ida K, Oka A, Mizuguchi M, Ogawa S *et al*: **Hepatoblastoma in a patient with sotos syndrome.** *J Pediatr* 2009, **155**(6):937-939.

REFERENZEN

38. Mussa A, Chiesa N, Porta F, Baldassarre G, Silengo MC, Ferrero GB: **The overlap between Sotos and Beckwith-Wiedemann syndromes.** *J Pediatr* 2010, **156**(6):1035-1036.
39. Mateos ME, Beyer K, Lopez-Laso E, Siles JL, Perez-Navero JL, Pena MJ, Guzman J, Matas J: **Simpson-Golabi-Behmel syndrome type 1 and hepatoblastoma in a patient with a novel exon 2-4 duplication of the GPC3 gene.** *Am J Med Genet A* 2013, **161A**(5):1091-1095.
40. Eichenmuller M, Trippel F, Kreuder M, Beck A, Schwarzmayr T, Haberle B, Cairo S, Leuschner I, von Schweinitz D, Strom TM *et al*: **The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features.** *J Hepatol* 2014, **61**(6):1312-1320.
41. Grobner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, Buchhalter I, Kleinheinz K, Rudneva VA, Johann PD, Balasubramanian GP, Segura-Wang M, Brabetz S *et al*: **Author Correction: The landscape of genomic alterations across childhood cancers.** *Nature* 2018, **559**(7714):E10.
42. Zimmermann A: **The emerging family of hepatoblastoma tumours: from ontogenesis to oncogenesis.** *Eur J Cancer* 2005, **41**(11):1503-1514.
43. Sumazin P, Chen Y, Trevino LR, Sarabia SF, Hampton OA, Patel K, Mistretta TA, Zorman B, Thompson P, Heczey A *et al*: **Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups.** *Hepatology* 2017, **65**(1):104-121.
44. Koch A, Denkhaus 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 Res* 1999, **59**(2):269-273.
45. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W: **Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.** *Nature* 1996, **382**(6592):638-642.
46. Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R: **Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1.** *Mech Dev* 1996, **59**(1):3-10.
47. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A: **The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(10):5522-5527.
48. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: **Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.** *Science* 1998, **281**(5382):1509-1512.
49. Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, Ohgi KA, Lin C, Gleiberman A, Wang J *et al*: **Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development.** *Cell* 2002, **111**(5):673-685.
50. Blaker H, Hofmann WJ, Rieker RJ, Penzel R, Graf M, Otto HF: **Beta-catenin accumulation and mutation of the CTNNB1 gene in hepatoblastoma.** *Genes Chromosomes Cancer* 1999, **25**(4):399-402.
51. Udatsu Y, Kusafuka T, Kuroda S, Miao J, Okada A: **High frequency of beta-catenin mutations in hepatoblastoma.** *Pediatr Surg Int* 2001, **17**(7):508-512.
52. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A *et al*: **Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(15):8847-8851.
53. Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, Nagorney DM, Burgart LJ, Roche PC, Smith DI *et al*: **Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas.** *Oncogene* 2002, **21**(31):4863-4871.
54. Tomlinson GE, Kappler R: **Genetics and epigenetics of hepatoblastoma.** *Pediatr Blood Cancer* 2012, **59**(5):785-792.
55. Kirkpatrick KL, Mokbel K: **The significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in cancer.** *Eur J Surg Oncol* 2001, **27**(8):754-760.
56. Sundin T, Hentosh P: **InTERTesting association between telomerase, mTOR and phytochemicals.** *Expert Rev Mol Med* 2012, **14**:e8.
57. Calado R, Young N: **Telomeres in disease.** *F1000 Med Rep* 2012, **4**:8.

REFERENZEN

58. Cukusic A, Skrobot Vidacek N, Sopta M, Rubelj I: **Telomerase regulation at the crossroads of cell fate.** *Cytogenet Genome Res* 2008, **122**(3-4):263-272.
59. Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M: **Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers.** *Cancer Sci* 2008, **99**(8):1528-1538.
60. Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO: **Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT).** *Gene* 2001, **269**(1-2):1-12.
61. Flores I, Blasco MA: **The role of telomeres and telomerase in stem cell aging.** *FEBS Lett* 2010, **584**(17):3826-3830.
62. Flores I, Evan G, Blasco MA: **Genetic analysis of myc and telomerase interactions in vivo.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(16):6130-6138.
63. Zhang XW, Liao HN, Tong TJ: **Telomere Shortening of MCF-7 Cells Caused by Antisense Telomerase cDNA.** *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 1999, **31**(5):527-530.
64. Shibata T, Ohta T, Tong KI, Kokubu A, Odogawa R, Tsuta K, Asamura H, Yamamoto M, Hirohashi S: **Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(36):13568-13573.
65. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD: **Dual roles of Nrf2 in cancer.** *Pharmacol Res* 2008, **58**(5-6):262-270.
66. Sporn MB, Liby KT: **NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context.** *Nat Rev Cancer* 2012, **12**(8):564-571.
67. Homma S, Ishii Y, Morishima Y, Yamadori T, Matsuno Y, Haraguchi N, Kikuchi N, Satoh H, Sakamoto T, Hizawa N *et al*: **Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(10):3423-3432.
68. Abazeed ME, Adams DJ, Hurov KE, Tamayo P, Creighton CJ, Sonkin D, Giacomelli AO, Du C, Fries DF, Wong KK *et al*: **Integrative radiogenomic profiling of squamous cell lung cancer.** *Cancer Res* 2013, **73**(20):6289-6298.
69. Hartmann W, Kuchler J, Koch A, Friedrichs N, Waha A, Endl E, Czerwitzki J, Metzger D, Steiner S, Wurst P *et al*: **Activation of phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signaling is essential in hepatoblastoma survival.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(14):4538-4545.
70. Jia D, Dong R, Jing Y, Xu D, Wang Q, Chen L, Li Q, Huang Y, Zhang Y, Zhang Z *et al*: **Exome sequencing of hepatoblastoma reveals novel mutations and cancer genes in the Wnt pathway and ubiquitin ligase complex.** *Hepatology* 2014, **60**(5):1686-1696.
71. Regel I, Eichenmuller M, Joppien S, Liebl J, Haberle B, Muller-Hocker J, Vollmar A, von Schweinitz D, Kappler R: **IGFBP3 impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors.** *Mol Cancer* 2012, **11**:9.
72. Wagner AE, Schwarzmayr T, Haberle B, Vokuhl C, Schmid I, von Schweinitz D, Kappler R: **SP8 Promotes an Aggressive Phenotype in Hepatoblastoma via FGF8 Activation.** *Cancers (Basel)* 2020, **12**(8).
73. Shih YL, Hsieh CB, Lai HC, Yan MD, Hsieh TY, Chao YC, Lin YW: **SFRP1 suppressed hepatoma cells growth through Wnt canonical signaling pathway.** *Int J Cancer* 2007, **121**(5):1028-1035.
74. 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.** *Pediatr Blood Cancer* 2007, **49**(3):240-249.
75. Eichenmuller M, Gruner I, Hagl B, Haberle B, Muller-Hocker J, von Schweinitz D, Kappler R: **Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth.** *Hepatology* 2009, **49**(2):482-490.
76. Regel I, Eichenmuller M, Mahajan UM, Hagl B, Benitz S, Haberle B, Vokuhl C, von Schweinitz D, Kappler R: **Downregulation of SFRP1 is a protumorigenic event in hepatoblastoma and correlates with beta-catenin mutations.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2020, **146**(5):1153-1167.

REFERENZEN

77. Li X, Adam G, Cui H, Sandstedt B, Ohlsson R, Ekstrom TJ: **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):221-229.
78. Hartmann W, Waha A, Koch A, Goodyer CG, Albrecht S, von Schweinitz D, Pietsch T: **p57(KIP2) is not mutated in hepatoblastoma but shows increased transcriptional activity in a comparative analysis of the three imprinted genes p57(KIP2), IGF2, and H19.** *Am J Pathol* 2000, **157**(4):1393-1403.
79. Foulstone E, Prince S, Zaccheo O, Burns JL, Harper J, Jacobs C, Church D, Hassan AB: **Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer.** *J Pathol* 2005, **205**(2):145-153.
80. Grimberg A, Cohen P: **Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis.** *J Cell Physiol* 2000, **183**(1):1-9.
81. Fuchs J, Rydzynski J, Hecker H, Mildemberger H, Burger D, Harms D, D VS, German Cooperative Liver Tumour Studies HB, Hb: **The influence of preoperative chemotherapy and surgical technique in the treatment of hepatoblastoma--a report from the German Cooperative Liver Tumour Studies HB 89 and HB 94.** *Eur J Pediatr Surg* 2002, **12**(4):255-261.
82. **S1-Leitlinie 025/011: Hepatoblastom** [https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-0111_S1_Hepatoblastom_2016-06.pdf]
83. Pritchard J, Brown J, Shafford E, Perilongo G, Brock P, Dicks-Mireaux C, Keeling J, Phillips A, Vos A, Plaschkes J: **Cisplatin, doxorubicin, and delayed surgery for childhood hepatoblastoma: a successful approach--results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology.** *J Clin Oncol* 2000, **18**(22):3819-3828.
84. Perilongo G, Maibach R, Shafford E, Brugieres L, Brock P, Morland B, de Camargo B, Zsiros J, Roebuck D, Zimmermann A *et al*: **Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard-risk hepatoblastoma.** *N Engl J Med* 2009, **361**(17):1662-1670.
85. Zsiros J, Maibach R, Shafford E, Brugieres L, Brock P, Czauderna P, Roebuck D, Childs M, Zimmermann A, Laithier V *et al*: **Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: final results of the SIOPEL-3HR study.** *J Clin Oncol* 2010, **28**(15):2584-2590.
86. Zsiros J, Brugieres L, Brock P, Roebuck D, Maibach R, Zimmermann A, Childs M, Pariente D, Laithier V, Otte JB *et al*: **Dose-dense cisplatin-based chemotherapy and surgery for children with high-risk hepatoblastoma (SIOPEL-4): a prospective, single-arm, feasibility study.** *Lancet Oncol* 2013, **14**(9):834-842.
87. Sullivan MJ: **Hepatoblastoma, cisplatin, and ototoxicity: good news on deaf ears.** *Cancer* 2009, **115**(24):5623-5626.
88. Knijnenburg SL, Mulder RL, Schouten-Van Meeteren AY, Bokenkamp A, Blufpand H, van Dulmen-den Broeder E, Veening MA, Kremer LC, Jaspers MW: **Early and late renal adverse effects after potentially nephrotoxic treatment for childhood cancer.** *Cochrane Database Syst Rev* 2013(10):CD008944.
89. Takemura G, Fujiwara H: **Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management.** *Prog Cardiovasc Dis* 2007, **49**(5):330-352.
90. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS: **Doxorubicin cardiomyopathy.** *Cardiology* 2010, **115**(2):155-162.
91. Lipshultz SE, Sambatakos P, Maguire M, Karnik R, Ross SW, Franco VI, Miller TL: **Cardiotoxicity and cardioprotection in childhood cancer.** *Acta Haematol* 2014, **132**(3-4):391-399.
92. Knight KR, Kraemer DF, Neuwelt EA: **Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development.** *J Clin Oncol* 2005, **23**(34):8588-8596.

REFERENZEN

93. Schultz KA, Ness KK, Whitton J, Recklitis C, Zebrack B, Robison LL, Zeltzer L, Mertens AC: **Behavioral and social outcomes in adolescent survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study.** *J Clin Oncol* 2007, **25**(24):3649-3656.
94. Meyers RL, Rowland JR, Krailo M, Chen Z, Katzenstein HM, Malogolowkin MH: **Predictive power of pretreatment prognostic factors in children with hepatoblastoma: a report from the Children's Oncology Group.** *Pediatr Blood Cancer* 2009, **53**(6):1016-1022.
95. Weber RG, Pietsch T, von Schweinitz D, Lichter P: **Characterization of genomic alterations in hepatoblastomas. A role for gains on chromosomes 8q and 20 as predictors of poor outcome.** *Am J Pathol* 2000, **157**(2):571-578.
96. Vita M, Henriksson M: **The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer.** *Semin Cancer Biol* 2006, **16**(4):318-330.
97. Rickman DS, Schulte JH, Eilers M: **The Expanding World of N-MYC-Driven Tumors.** *Cancer Discov* 2018, **8**(2):150-163.
98. Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F: **Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology.** *Lancet Oncol* 2003, **4**(8):472-480.
99. Kress TR, Sabo A, Amati B: **MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production.** *Nat Rev Cancer* 2015, **15**(10):593-607.
100. Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN: **Transcriptional activities of the Myc and Max proteins in mammalian cells.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1992, **182**:435-443.
101. O'Brien EM, Selfe JL, Martins AS, Walters ZS, Shipley JM: **The long non-coding RNA MYCNOS-01 regulates MYCN protein levels and affects growth of MYCN-amplified rhabdomyosarcoma and neuroblastoma cells.** *BMC Cancer* 2018, **18**(1):217.
102. Brockmann M, Poon E, Berry T, Carstensen A, Deubzer HE, Rycak L, Jamin Y, Thway K, Robinson SP, Roels F *et al*: **Small molecule inhibitors of aurora-a induce proteasomal degradation of N-myc in childhood neuroblastoma.** *Cancer Cell* 2013, **24**(1):75-89.
103. Schnepf RW, Maris JM: **Targeting MYCN: a good BET for improving neuroblastoma therapy?** *Cancer Discov* 2013, **3**(3):255-257.
104. Sehdev V, Peng D, Soutto M, Washington MK, Revetta F, Ecsedy J, Zaika A, Rau TT, Schneider-Stock R, Belkhir A *et al*: **The aurora kinase A inhibitor MLN8237 enhances cisplatin-induced cell death in esophageal adenocarcinoma cells.** *Mol Cancer Ther* 2012, **11**(3):763-774.
105. Zanellato I, Colangelo D, Osella D: **JQ1, a BET inhibitor, synergizes with cisplatin and induces apoptosis in highly chemoresistant malignant pleural mesothelioma cells.** *Curr Cancer Drug Targets* 2017.
106. Sivaprakasam P, Gupta AA, Greenberg ML, Capra M, Nathan PC: **Survival and long-term outcomes in children with hepatoblastoma treated with continuous infusion of cisplatin and doxorubicin.** *J Pediatr Hematol Oncol* 2011, **33**(6):e226-230.
107. Liu H, Cheng L, Cao D, Zhang H: **Suppression of miR-21 Expression Inhibits Cell Proliferation and Migration of Liver Cancer Cells by Targeting Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN).** *Med Sci Monit* 2018, **24**:3571-3577.
108. Lu Y, Han B, Yu H, Cui Z, Li Z, Wang J: **Berberine regulates the microRNA-21-ITGBeta4-PDCD4 axis and inhibits colon cancer viability.** *Oncol Lett* 2018, **15**(4):5971-5976.
109. Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, Ford L, Weidhaas JB, Brown D, Bader AG, Slack FJ: **The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer.** *Cell Cycle* 2008, **7**(6):759-764.
110. Armand-Labit V, Pradines A: **Circulating cell-free microRNAs as clinical cancer biomarkers.** *Biomol Concepts* 2017, **8**(2):61-81.
111. Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, Senzer N, Eklund AC, Han J, Nemunaitis J: **MicroRNA profile analysis of human prostate cancers.** *Cancer Gene Ther* 2009, **16**(3):206-216.
112. Selth LA, Townley SL, Bert AG, Stricker PD, Sutherland PD, Horvath LG, Goodall GJ, Butler LM, Tilley WD: **Circulating microRNAs predict biochemical recurrence in prostate cancer patients.** *Br J Cancer* 2013, **109**(3):641-650.

REFERENZEN

113. Huang YH, Liang KH, Chien RN, Hu TH, Lin KH, Hsu CW, Lin CL, Pan TL, Ke PY, Yeh CT: **A Circulating MicroRNA Signature Capable of Assessing the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Patients.** *Sci Rep* 2017, **7**(1):523.
114. Riazalhosseini B, Mohamed R, Apalatomy YD, Langmia IM, Mohamed Z: **Circulating microRNA as a marker for predicting liver disease progression in patients with chronic hepatitis B.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2017, **50**(2):161-166.
115. Zhang Y, Li T, Qiu Y, Zhang T, Guo P, Ma X, Wei Q, Han L: **Serum microRNA panel for early diagnosis of the onset of hepatocellular carcinoma.** *Medicine (Baltimore)* 2017, **96**(2):e5642.
116. Fulciniti M, Amodio N, Bandi RL, Cagnetta A, Samur MK, Acharya C, Prabhala R, D'Aquila P, Bellizzi D, Passarino G *et al*: **miR-23b/SP1/c-myc forms a feed-forward loop supporting multiple myeloma cell growth.** *Blood Cancer J* 2016, **6**:e380.
117. Wang W, Li Y, Liu N, Gao Y, Li L: **MiR-23b controls ALDH1A1 expression in cervical cancer stem cells.** *BMC Cancer* 2017, **17**(1):292.
118. He RQ, Wu PR, Xiang XL, Yang X, Liang HW, Qiu XH, Yang LH, Peng ZG, Chen G: **Downregulated miR-23b-3p expression acts as a predictor of hepatocellular carcinoma progression: A study based on public data and RT-qPCR verification.** *Int J Mol Med* 2018, **41**(5):2813-2831.
119. Veronese A, Lupini L, Consiglio J, Visone R, Ferracin M, Fornari F, Zanasi N, Alder H, D'Elia G, Gramantieri L *et al*: **Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus.** *Cancer Res* 2010, **70**(8):3140-3149.
120. Lu XY, Chen D, Gu XY, Ding J, Zhao YJ, Zhao Q, Yao M, Chen Z, He XH, Cong WM: **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.
121. Ma N, Li F, Li D, Hui Y, Wang X, Qiao Y, Zhang Y, Xiang Y, Zhou J, Zhou L *et al*: **Igf2-derived intronic miR-483 promotes mouse hepatocellular carcinoma cell proliferation.** *Mol Cell Biochem* 2012, **361**(1-2):337-343.
122. 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):1312-1317.
123. Han K, Gennarino VA, Lee Y, Pang K, Hashimoto-Torii K, Choufani S, Raju CS, Oldham MC, Weksberg R, Rakic P *et al*: **Human-specific regulation of MeCP2 levels in fetal brains by microRNA miR-483-5p.** *Genes Dev* 2013, **27**(5):485-490.
124. Veronese A, Visone R, Consiglio J, Acunzo M, Lupini L, Kim T, Ferracin M, Lovat F, Miotto E, Balatti V *et al*: **Mutated beta-catenin evades a microRNA-dependent regulatory loop.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(12):4840-4845.
125. Gray SG, Eriksson T, Ekstrom C, Holm S, von Schweinitz D, Kogner P, Sandstedt B, Pietsch T, Ekstrom TJ: **Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas.** *Br J Cancer* 2000, **82**(9):1561-1567.
126. Maibach R, Roebuck D, Brugieres L, Capra M, Brock P, Dall'Igna P, Otte JB, De Camargo B, Zsiros J, Zimmermann A *et al*: **Prognostic stratification for children with hepatoblastoma: the SIOPEL experience.** *Eur J Cancer* 2012, **48**(10):1543-1549.

9. Anhang Original Publikationen

Corinna Eberherr, Alexander Beck, Christian Vokuhl, Kristina Becker, Beate Häberle, Dietrich von Schweinitz, Roland Kappler

Targeting excessive MYCN expression using MLN8237 and JQ1 impairs the growth of hepatoblastoma cells.

International journal of oncology 54: 1853-1863, 2019

Jakob Benjamin Wilhelm Weiss, Alexandra Elisabeth Wagner, **Corinna Eberherr**, Beate Häberle, Christian Vokuhl, Dietrich von Schweinitz, Roland Kappler

High expression of IGF2-derived intronic miR-483 predicts outcome in hepatoblastoma.

Cancer biomarkers 28: 321-328, 2020

Targeting excessive *MYCN* expression using MLN8237 and JQ1 impairs the growth of hepatoblastoma cells

CORINNA EBERHERR¹, ALEXANDER BECK¹, CHRISTIAN VOKUHL², KRISTINA BECKER¹,
BEATE HÄBERLE¹, DIETRICH VON SCHWEINITZ¹ and ROLAND KAPPLER¹

¹Department of Pediatric Surgery, Dr. von Hauner Children's Hospital, University Hospital, LMU Munich, D-80337 Munich;

²Institute of Paidopathology, Pediatric Tumor Registry, Christian-Albrecht's-University Kiel, D-24105 Kiel, Germany

Received July 13, 2018; Accepted January 23, 2019

DOI: 10.3892/ijo.2019.4741

Abstract. Hepatoblastoma (HB) is the most common liver tumor in children under the age of 3 years worldwide. While many patients achieve good outcomes with surgical resection and conventional chemotherapy, there is still a high-risk population that exhibits a poor treatment response and unfavorable prognosis, which warrants the search for novel treatment options. In recent years, it has become clear that genetic events alone are not sufficient to explain the aggressive phenotype of this embryonal malignancy. Instead, epigenetic modifications and aberrant gene expression seem to be key drivers of HB. In the present study, expression analyses such as reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction revealed that the oncogene, *MYCN* proto-oncogene basic-helix-loop-helix transcription factor (*MYCN*) was upregulated in HB and other pediatric liver tumors, due to the transcriptional activity of its antisense transcript *MYCN* opposite strand (*MYCNOS*). Pyrosequencing demonstrated the hypomethylated regions in the promoter of *MYCN* and *MYCNOS*, suggesting that an epigenetic mechanism may underlie the induction of aberrant expression. Transient *MYCN* knockdown in HB cells resulted in growth inhibition over time. In addition, treating HB cells with the *MYCN* inhibitors JQ1 and MLN8237 led to the significant downregulation of *MYCN* either at the mRNA or protein levels, respectively. The underlying mechanism of action of the two inhibitors was revealed to be associated with the induction of dose-dependent growth arrest, by arresting cells at either the G1/G0 or G2 phase. Furthermore, MLN8237 and JQ1 were able to cause spindle disturbances and/or apoptosis in HB cells. The present results suggest that *MYCN* may be a promising biomarker for

HB and a potential therapeutic target in patients with tumors overexpressing *MYCN*.

Introduction

Hepatoblastoma (HB) is the most common type of liver tumor in children worldwide and mainly affects infants and toddlers between the ages of 6 months and 3 years (1). The characteristically early manifestation of these embryonal tumors suggests that comparatively few genetic alterations are necessary for the formation of a malignant phenotype (2). In fact, systematic analysis of HB by exome sequencing revealed mutations in the β -catenin (*CTNNB1*) gene as the only recurrent alteration, which occurs in approximately two-thirds of all patients (3,4). The oncogenic mutation of *CTNNB1* is known to trigger the pathological activation of the Wnt signaling pathway, which can also occur in *CTNNB1*-wildtype HB via mutations in the genes, adenomatous polyposis coli, axin 1 and axin 2 (5,6). Notably, the activation of mutant *Cttnb1* in liver progenitor cells has been shown to cause the development of HB in mice by 26 weeks of age (7). However, although Wnt activation has been proven to drive the development of pediatric liver tumors, identification of other molecular mechanisms that are responsible for the manifestation of different histopathological subtypes of HB and more importantly the varying response to chemotherapy and thus the outcome is still warranted (8).

The use of genome-wide expression analysis methods has not only helped to improve our understanding of the molecular mechanisms that drive tumorigenesis but, by identifying subtype-specific changes, fuels the hope of achieving the biomarker-based stratification of tumors, and thereby improve prognosis estimation and risk-adapted therapies (9). A first step in this direction in the field of HB has been the description of a unique gene signature which allows for, based on an expression determination of only 16 genes, the classification of HB into 2 tumor subtypes (10). These subtypes not only reflect the different phases of liver development, but also show a strong prognostic divergence (10). Thus, tumors of the so-called C1 subtype exhibit a higher degree of differentiation with mostly fetal histology and a better prognosis, while the C2 tumors usually have an embryonic differentiation with a poorer prognosis and a higher tumor stage. One of the genes with a significant differential expression between

Correspondence to: Dr. Roland Kappler, Department of Pediatric Surgery, Dr. von Hauner Children's Hospital, University Hospital, LMU Munich, Lindwurmstr. 2a, D-80337 Munich, Germany
E-mail: roland.kappler@med.uni-muenchen.de

Key words: *MYCN* proto-oncogene basic-helix-loop-helix transcription factor, *MYCN* opposite strand, hepatoblastoma, MLN8237, JQ1

C1 and C2 tumor subtypes was MYCN proto-oncogene basic-helix-loop-helix transcription factor (*MYCN*), which maps to 2p24.1, a chromosomal region known to be frequently duplicated in HB (11). Upregulation of *MYCN* expression serves a crucial role in several tumors, such as lung and breast cancer as well as malignancies of neural origin including glioblastoma, medulloblastoma and neuroblastoma (12). In neuroblastoma, transcriptional upregulation is mainly caused by the amplification of the *MYCN* locus (13). *MYCN* encodes a nuclear phosphoprotein that dimerizes with MYC interacting protein X to form a complex that binds to the regulatory regions of MYCN-regulated genes (14). It is generally believed that aberrant *MYCN* expression increases cellular proliferation by inducing cell-cycle progression as well as inhibiting apoptosis (15). Taken together, these findings qualify MYCN as an interesting target for the treatment of HB.

Materials and methods

Patients and tumor cell lines. A total of 61 liver tumor specimens [47 HB, 4 transitional liver cell tumors (TLCT), and 10 pediatric hepatocellular carcinomas (HCC)] were obtained from 61 pediatric patients (32 males, 29 females) undergoing surgical resection in the Department of Pediatric Surgery (University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany). The inclusion criteria were that the patients were aged <20 years and had a histologically proven diagnosis of HB, TLCT or HCC. Patients with underlying liver disease were excluded from the study. The clinicopathological features of the patients are presented in Table I. Written informed consent was obtained from each patient or the parents if younger than 12 years and the study protocol was approved by the Ludwig-Maximilians-University Ethics Committee (Munich, Germany; no. 431-11). Furthermore, 3 human HB cell lines were used, including HepT1 (provided by Dr. Torsten Pietsch, Institute of Neuropathology, University of Bonn, Bonn, Germany), HUH6 (Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka, Japan) and HepG2 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) as well as the hepatocellular carcinoma cell line HUH7 (kindly provided by Dr. Enrico de Toni, Department of Medicine 2, University of Munich, Munich, Germany). Cells were grown at 37°C in RPMI-1640 medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) containing 10% fetal calf serum (FCS; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.), 1% antibiotics and glutamine supplement.

Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). RNA extraction and purification of tissues and cells as well as cDNA synthesis were performed as described previously (16). Quantification of gene expression was conducted using TaqMan[®] Gene expression assays (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) for *MYCN* (Hs00232074_m1), *MYCNOS* (Hs01040745_m1) and the house-keeping gene TATA-box binding protein (*TBP*; Hs00427620_m1) as well as the TaqMan universal MasterMix II (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) according to the manufacturer's instructions. Primer sequences are commercially unavailable (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). RT-qPCR amplifications were conducted in doublets on a Mastercycler

Realplex² instrument (Eppendorf, Hamburg, Germany) and consisted of 2 min uracil-N-glycosylase incubation at 50°C, 10 min DNA polymerase activation at 95°C, and 45 cycles of 15 sec denaturation at 95°C, and primer annealing and extension for 1 min at 60°C. The 2^{-ΔΔC_q} method was used to calculate the relative mRNA expression levels from the means of *MYCN/MYCNOS* and *TBP* (17).

Immunohistochemistry. Frozen tumor tissue sections were embedded in Tissue-Tek Optimal Cutting Temperature compound (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, USA; 5 μm-thick), were fixed for 10 min in ice-cold acetone and endogenous peroxidase activity was quenched using 0.3% hydrogen peroxide in bi-distilled water for 10 min. Following 1 h of blocking with 10% FCS at 37°C, the mouse anti-human N-MYC antibody clone B8.4.B (cat. no. sc-53993; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) diluted to 1:200 in PBS was applied to the sections, which were then incubated overnight at 4°C. Following three washes with PBS, the sections were then covered with one drop of anti-mouse immunoglobulin G (IgG; ImmPRESS HRP reagent kit; Vector Laboratories, Inc.; Maravai LifeSciences, San Diego, CA, USA) and incubated for 30 min at room temperature. Signal detection was conducted using the liquid 3,3'-diaminobenzidine substrate chromogen system (Dako; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) for 30 min at 37°C. Sections were then counterstained with hematoxylin for 5 min at 37°C and mounted with glycerol mounting medium (Dako; Agilent Technologies, Inc.). Consecutive sections of the same tumor tissue were then stained with hematoxylin and eosin without prior immunohistochemical detection and used for histopathological evaluation on an Axioplan light microscope (Zeiss GmbH, Jena, Germany) at a magnification of x100 and x200.

Proliferation assays. Cell proliferation was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays. Cells (of all cell lines) were seeded at a density of 5-10x10³ cells per well into 96-well plates (NUNC, Langenselbold, Germany) in 100 μl cell culture medium. Following overnight attachment, cells were treated for 48 h at 37°C with various concentrations (1, 10, 100 nM, 1 and 10 μM) of MLN8237 (Alisertib; Axon Medchem, Groningen, Netherlands) and JQ1 (BIOMOL International; Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA) or the solvent DMSO (Merck KGaA). Cell lines were alternatively transfected with 200 nM small interfering (si)-RNA Hs_MYCN_6 FlexiTube siRNA (SI03087518; 5'-CGTGCCGGAGTTGGTAAAGAA-3'; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) or 200 nM siGENOME non-targeting siRNA #1 (GE Healthcare Dharmacon, Inc., Lafayette, CO, USA; sequences are commercially unavailable) by electroporation and then directly cultured at a density of 5-10x10³ cells in 96-well plates overnight at 37°C prior to subsequent experimentation.

To assess cell viability, 10 μl MTT (Sigma-Aldrich; Dramstadt, Germany) labeling agent (5 mg/ml in PBS) was added to each well prior to 4 h incubation at 37°C. Media-containing wells without cells were used for background estimation. For cell lysis, 100 μl of the SDS-HCl solution (10% SDS/0.01M HCl) was added to each well. The

Table I. Clinicopathological features of different types of pediatric liver cancers and their association with *MYCN* and *MYCNOS* gene expression.

| Category | Patients with pediatric liver cancer, n | | | P-value | |
|---------------------|-----------------------------------------|------------|-------------------------|-------------|---------------|
| | HB (n=47) | TLCT (n=4) | HCC (n=10) ^a | <i>MYCN</i> | <i>MYCNOS</i> |
| Age range (months) | 0-56 | 11-128 | 92-199 | 0.8414 | 0.3881 |
| Metastasis | | | | 0.9195 | 0.5297 |
| No | 30 | 3 | 7 | | |
| Yes | 17 | 1 | 2 | | |
| Vascular invasion | | | | 0.4371 | 0.5526 |
| No | 38 | 3 | 7 | | |
| Yes | 9 | 1 | 2 | | |
| Multifocal growth | | | | 0.7421 | 0.8147 |
| No | 35 | 2 | 6 | | |
| Yes | 12 | 2 | 2 | | |
| Extrahepatic growth | | | | 0.8020 | 0.8270 |
| No | 44 | 4 | 6 | | |
| Yes | 3 | 0 | 2 | | |
| PRETEXT stage | | | | 0.7402 | 0.5787 |
| I | 3 | 0 | 2 | | |
| II | 12 | 2 | 2 | | |
| III | 21 | 1 | 3 | | |
| IV | 11 | 1 | 0 | | |
| Embryonal histology | | | | 0.0166 | 0.0130 |
| No | 34 | 4 | n.a. | | |
| Yes | 13 | 0 | n.a. | | |
| Outcome | | | | 0.2936 | 0.8646 |
| Alive | 40 | 3 | 8 | | |
| Succumbed | 7 | 1 | 2 | | |

^aFor 3 HCC patients, only limited clinical data were available so some categories do not present the data of the entire patient cohort. n.a., not applicable; HB, hepatoblastoma; TLCT, transitional liver cell tumor; HCC, hepatocellular carcinoma.

plate was incubated overnight at 37°C. Cell viability was detected by measuring the optical density at a wavelength of 595 nm using the GENios multi scanner microplate reader (Tecan Group, Ltd., Männedorf, Switzerland). Each experiment was performed in duplicate.

Cell screening assay. Morphological changes were detected by means of microscopy once the cells had been treated for 48 h at 37°C with vehicle (DMSO), 10 µM MLN8237 (in HepG2 cells only) or 1.0 µM MLN8237 (in HepT1, HUH6 and HUH7 cells), or 10 µM JQ1 (in HepT1 and HepG2 cells) or 0.5 µM JQ1 (in HUH6 and HUH7 cells) using an inverted Axiovert 40 CFL microscope (Zeiss GmbH) equipped with a Powershot G6 digital device (Canon, Inc., Tokyo, Japan).

Western blot analysis. Cells were seeded at a density of 1x10⁶ per 10 cm cell culture dish. Following overnight attachment, cells were treated for 48 h at 37°C with MLN8237, JQ1 (both at 10 µM for HepT1 and HepG2, and 0.5 µM for HUH6 and HUH7) or DMSO. Once treated, non-adherent and adherent

cells were pooled together in ice-cold lysis buffer [0.5% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate and cOmplete Mini protease inhibitor (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)]. Protein lysates were incubated on ice for 30 min with occasional vortexing. Following centrifugation for 30 min at 4°C and 13,000 x g, protein lysates without cell debris were stored at 4°C until use. The protein concentration was determined by a Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Proteins (20 µg) were loaded on a 4-12% BIS TRIS NuPage Gel (Novex; Thermo Fisher Scientific, Inc.), separated under reducing conditions and then transferred to a nitrocellulose blotting membrane (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). Thereafter, membranes were blocked with PBS/0.1% Tween-20/5% non-fat dry milk overnight at 4°C. Next, antibodies including mouse anti-human N-MYC clone B8.4.B (1:500; cat. no. sc-53993; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit anti-human poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase (PARP; 1:1,000; cat. no. 9542) or rabbit anti-human β-actin (1:2,500; cat. no. 4967S; both Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)

were added to the cells overnight at 4°C. For detection, membranes were incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulin secondary antibody (1:2,000; cat. no. PO448; Dako; Agilent Technologies, Inc.). Signals were captured using the enhanced western blotting reagent detection system and Hyperfilm high performance autoradiography films (both GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

Apoptosis and cell cycle analysis. Cells (all cell lines) were seeded in 6-well plates and following 24 h, exposed to DMSO, MLN8237 or JQ1 at various concentrations (10 µM for HepG2, and 1 µM for HepT1, HUH6 and HUH7) for 48 h at 37°C. Fixation and permeabilization of cells were performed by the dropwise addition of 70% ethanol while vortexing and incubating at -20°C for at least 2 h. Permeabilized cells were washed with PBS and DNA was stained using 0.02 mg/ml propidium iodide (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) and 0.2 mg/ml RNaseA (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) in PBS/0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) for 30 min at room temperature in the dark. The cell cycle was analyzed with a BD-LSRFORTESSA flow cytometer (BD Biosciences; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) and Flowing software 2.5.1 (www.floving-software.com/).

Immunofluorescence staining. A total of 7.5x10⁴ cells (all cell lines) were plated onto Lab-Tek II Chamber Slides (Thermo Fisher Scientific, Inc.) with a diameter of 18 mm and then incubated in 12-well plates overnight at 37°C prior to treatment. Following 24 h of treatment with MLN8237 or DMSO at the indicated concentrations (10 µM for HepG2, and 1 µM for HepT1, HUH6 and HUH7), cells were fixed in 4% formaldehyde-phosphate-buffered saline for 15 min at room temperature, permeabilized for 15 min with 0.15% Triton X-100 in PBS at room temperature and blocked for 30 min with 1% bovine serum albumin (BSA; no. 8076.1; Carl Roth GmbH + Co., KG, Karlsruhe, Germany) in PBS at room temperature. Cells were then incubated with rat-anti-human α-tubulin (cat. no. CBL270; EMD Millipore, Billerica, MA, USA) 1:100 diluted in 1% (v/v) BSA in PBS overnight at 4°C in a wet chamber. Following several washing steps with PBS, cells were permeabilized for 10 min with 0.15% Triton X-100 in PBS at room temperature and blocked for 7 min at room temperature in 1% (v/v) BSA in PBS. Cells were then incubated for 45 min in the dark with Alexa Fluor 555 Goat anti-rat IgG (H+L) (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) at a dilution of 1:200. After three rinses with PBS, microscope slides were mounted with Vectashield containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Images were acquired using the Olympus Fluoview™ FV1000 confocal microscope.

Bisulfite pyrosequencing. The methylation status of 3 CpG-rich regions at the *MYCN/MYCNOS* locus was determined via bisulfite pyrosequencing. Briefly, the genomic DNA of 30 HB and 11 normal liver tissues was bisulfite modified using an Epitect Bisulfite kit (Qiagen, Inc.) according to the manufacturer's instructions. Subsequent PCR amplification was performed using the following forward (F) and reverse (R)

pyrosequencing primers (PS) designed with PyroMark Assay Design software (Qiagen, Inc.): PS1-F, biotin-GGTGTGTTA-GATTTTTTAGTTAAT and PS1-R, ACAAACCCCTACT CCTTACCT; PS3-F, GAGAGTTAGAATTTTGTAGTTAGG AATAGT and PS3-R, biotin-TCCCCCCTCCTTTATATA-CAAATCTCT; and PS4-F, AGTTTTTAATTAAGTTATTGG TAGGAGTAT and PS4-R, biotin-AAACCCCATATCCA-CAAATCC. Pyrosequencing was performed with the sequencing primers PS1-S (ATATCCTCCAATAACTAC AATCTAT), PS3-S (AATGGTAGTTTTTAAAGTT) and PS4-S (AGTTATTGGTAGGAGTATTTT), and data analysis was performed with the PyroMark Q24 system (Qiagen, Inc.) following the manufacturer's instructions.

Statistical analyses. Data were expressed as the mean ± standard deviation, and statistical analyses were performed with the Student's unpaired or paired t-test, the Spearman's r correlation test and the Mann-Whitney-U test. Grouped analyses were performed by employing non-parametric one-way analysis of variance (ANOVA) with a Dunn's correction for multiple comparisons or two-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test. P<0.05 was considered to indicate a statistically significant difference. GraphPad Prism 6 biostatistics software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) was used for all statistical analyses.

Results

MYCN is upregulated in pediatric liver tumors due to the transcriptional activity of its antisense transcript, MYCNOS. *MYCN* expression was initially measured via RT-qPCR at the mRNA level in a comprehensive tumor collection consisting of 47 primary HB, 4 TLCT, 10 pediatric HCC, 4 liver tumor cell lines and 16 non-tumorous liver samples. The results revealed a significant upregulation of *MYCN* expression in all tumor samples and cell lines, when compared with normal liver tissue (Fig. 1A). Notably, the marked *MYCN* upregulation gradually increased across the samples, from HCC (16.2-fold) to TLCT (57.3-fold) and finally to HB (87.4-fold). In addition, histological (Fig. 1D) and immunohistochemical staining for *MYCN* protein (Fig. 1E) in HB tissues demonstrated that *MYCN* overexpression originated from tumor cells. As pediatric liver cancers lack amplifications at the *MYCN* locus (3), the present study next investigated if the antisense transcript *MYCNOS*, which maps to the same region on the opposite strand (Fig. 2A) and has been reported to positively regulate *MYCN* transcription (18), is associated with *MYCN* overexpression. The results revealed a significant overexpression of *MYCNOS* in all tumor samples, again with highest upregulation in HB tissues (Fig. 1B). Consistent with these results, a highly significant correlation between *MYCN* and *MYCNOS* mRNA levels was detected (Fig. 1C).

In order to validate the prognostic value of this data, correlations between *MYCN* and *MYCNOS* expression and clinicopathological characteristics were evaluated. By comparing the expression levels between patients with or without clinical high risk features such as metastasis, vascular invasion, multifocal or extrahepatic growth, high PRETEXT stage, embryonal histology, and age of onset >5 years, it was demonstrated that embryonal histology was the only

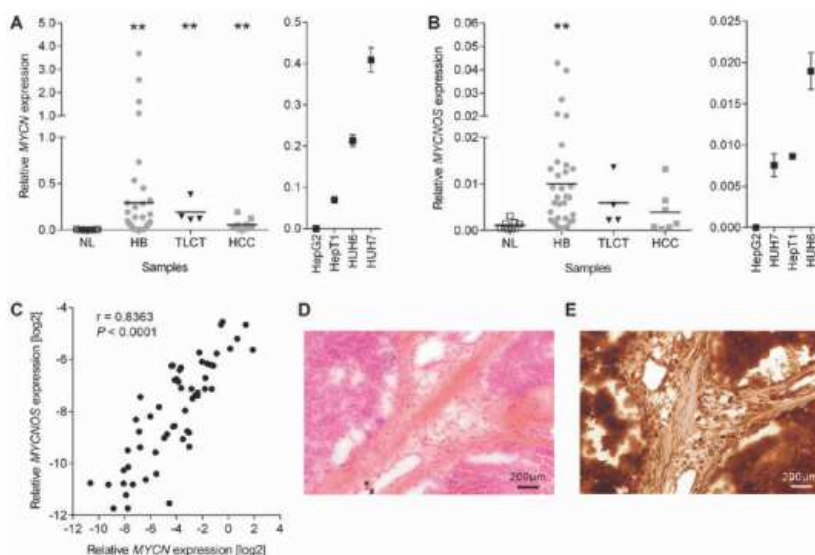


Figure 1. Expression analysis. Expression levels of (A) *MYCN* and (B) *MYCNOS* in the NL, HB, TLCT and HCC as well as the 4 liver tumor cell lines were measured by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction and normalized to the expression of the house-keeping gene *TBP*, with the mean presented as a horizontal line across the data points. Significances were determined by non-parametric one-way analysis of variance with a Dunn's correction for multiple comparisons. ** $P < 0.01$ vs. NL. (C) The correlation between \log_2 -transformed *MYCN* and *MYCNOS* expression levels was calculated using Spearman r correlation. (D and E) Representative photographs (magnification, $\times 100$; scale bars, $200 \mu\text{m}$) of a (D) hematoxylin and eosin and (E) *MYCN* stained hepatoblastoma. NL, normal liver; HB, hepatoblastoma; TLCT, transitional liver cell tumor; HCC, hepatocellular carcinoma; *MYCN*, *MYCN* proto-oncogene basic-helix-loop-helix transcription; *MYCNOS*, *MYCN* opposite strand; *TBP*, TATA-box binding protein.

characteristic to be significantly associated with high *MYCN* and *MYCNOS* expression (Table I). There was no expression difference in regard to outcome. Collectively, these results suggest that concomitant overexpression of *MYCN* and *MYCNOS* may be a general phenomenon in pediatric liver tumors, especially in those with more undifferentiated histology.

Hypomethylation of the MYCN/MYCNOS locus is associated with high expression levels. DNA methylation has been described as an important molecular mechanism to control the transcriptional activity of genes (19). By examining 3 CpG-rich regions located at the interface of *MYCN* and *MYCNOS* (Fig. 2A) by means of pyrosequencing, the present study reported a low methylation level of $<15\%$ in all of the investigated samples (Fig. 2B-E). Notably, the median methylation level was significantly lower in the 30 pediatric liver tumors when compared with the 11 normal liver samples. Consequently, *MYCN* (Fig. 2F-H) and *MYCNOS* (data not shown) expression was negatively correlated with DNA methylation levels.

Transient MYCN knockdown impedes the growth of HB cells. Having revealed that *MYCN* was overexpressed in the vast majority of pediatric liver tumors, the present study then evaluated whether liver tumor cell growth is dependent on *MYCN*. siRNA-mediated knockdown of *MYCN* in HepT1, HUH6 and HUH7 cells (the cell lines that exhibited high *MYCN* expression levels; Fig. 1A), was therefore employed. Following transient transfection, the expression levels of

MYCN mRNA were significantly reduced after 24, 48 and 72 h when compared with the control transfected cells, being the most efficient following 24 h (Fig. 3A). The levels of *MYCNOS* expression was unchanged (data not shown). To assess whether the reduced mRNA levels of *MYCN* had an impact on cell proliferation, the present study generated cell growth curves over a time course of 0, 24, 48 and 72 h for *MYCN* depleted and control cells using MTT assays. Transient knockdown of *MYCN* led to a slightly impeded growth rate in HepT1, HUH6 and HUH7 cells when compared with control transfected cells during the first 2 days (Fig. 3B). However, the cell growth rate of HepT1 and HUH6 cells recovered 72 h post-transient siMYCN transfection, which could be associated with the decline of *MYCN* knockdown.

MLN8237 and JQ1 impact MYCN either at the protein or RNA level. In order to sustain the anti-proliferative effect observed following siRNA-mediated *MYCN* inhibition, the present study examined the effects of MLN8237 and JQ1, 2 known *MYCN* inhibitors already pre-clinically tested in various types of cancers (18,19), on the viability of liver cancer cells. The small molecule MLN8237 is believed to disrupt the Aurora-A/*MYCN* complex, thereby promoting the degradation of the *MYCN* protein mediated by F-box and WD repeat domain containing 7 ubiquitin ligase (20). JQ1 is an inhibitor of the bromodomain and extraterminal domain family of bromodomains that displaces the bromodomain containing 4 domain from the *MYCN* promoter and thus causes a potent depletion of *MYCN* transcription (21). As anticipated,

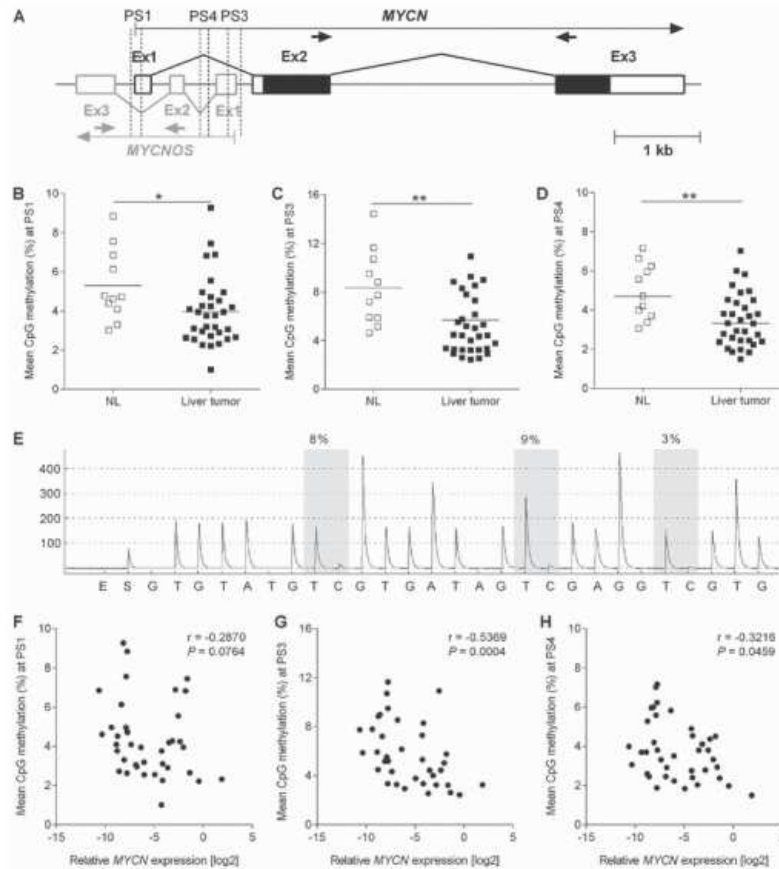


Figure 2. Methylation analysis. (A) Schematic drawing of the *MYCN/MYCNOS* locus with the exons of the *MYCN* gene (in black) and the *MYCNOS* antisense transcript (in grey); the filled boxes indicate the protein coding portions. The genomic location of the reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction primers (arrows) and the pyrosequencing assays (dotted lines indicate the start and end of the analyzed regions) are given. (B-D) Pyrosequencing of 11 NL tissues and 30 HBs was performed to measure the percentage of DNA methylation in the CpG-rich regions for (B) PS1, (C) PS3 and (D) PS4 of the *MYCN/MYCNOS* locus. The mean methylation values (indicated by the horizontal line across the data points) and statistical significances calculated by unpaired Mann-Whitney test are presented. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, as indicated. (E) Representative pyrogram trace of a NL sample obtained following the pyrosequencing of the PS4 region of the *MYCN/MYCNOS* locus containing 3 CpG sites (with potentially methylated cytosines shaded in gray). The y-axis represents the signal intensity in arbitrary units, while the x-axis shows the dispensation order. The percentage of DNA methylation at the individual CpG positions is shown above the pyrogram. (F-H) Correlation of log₂-transformed *MYCN* expression levels and the mean methylation values of (F) PS1, (G) PS3 and (H) PS4 were calculated using Spearman's r correlation. NL, normal liver; HB, hepatoblastoma; *MYCN*, *MYCN* proto-oncogene basic-helix-loop-helix transcription; *MYCNOS*, *MYCN* opposite strand; PS1-4, pyrosequencing primers 1-4.

MLN8237 treatment resulted in a marked reduction in MYCN protein levels in the 3 tumor cell lines with high MYCN expression, namely HepT1, HUH6 and HUH7 (Fig. 4A). Notably, a concomitant reduction in MYCN transcripts was also observed in HepT1 and HUH7 cells, for which there is currently no explanation at the molecular level. By contrast, the major effect of JQ1 treatment was the downregulation of MYCN mRNA observed in all tumor cell lines, which resulted in reduced protein levels in the three cell lines that highly expressed MYCN (Fig. 4B). The low MYCN expressing cell line, HepG2 (Fig. 1A), exhibited unchanged protein levels upon treatment with JQ1 and MLN8237 (Fig. 4A and B). In conclusion, MLN8237 and JQ1 are potent MYCN inhibitors

that interfere with MYCN protein abundance via different molecular mechanisms.

MLN8237 and JQ1 induce dose-dependent growth arrest by trapping cells in either the G1/G0 or G2 phase. To investigate the role of MYCN inhibition as a possible treatment option in pediatric liver tumors, the present study examined the effect of MLN8237 and JQ1 on the viability of 4 liver cancer cell lines using MTT assays. Treatment with MLN8237 resulted in a potent reduction of cell viability in a dose-dependent manner in the 3 cell lines with high MYCN expression, whereas the MYCN low expressing cell line HepG2 was unaffected by the treatment (Fig. 5A). Similarly, treatment with low doses

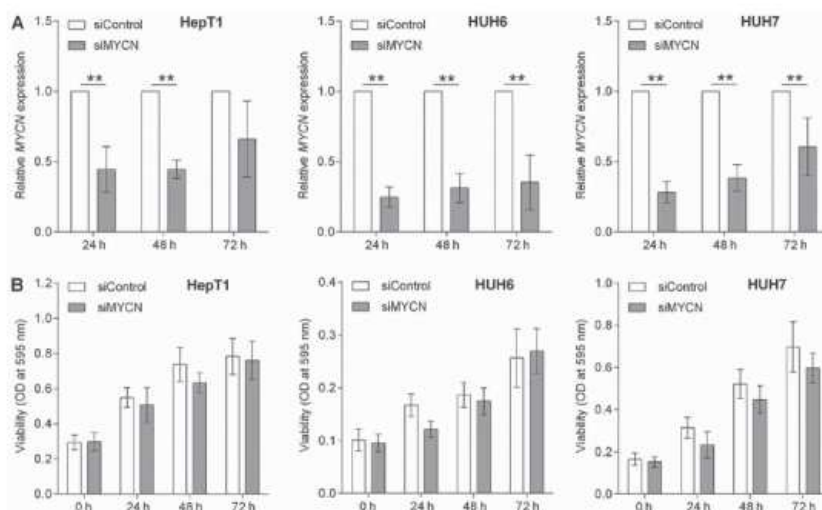


Figure 3. *MYCN* knockdown. (A) HepT1, HUH6 and HUH7 cells were transiently transfected with either siRNA against *MYCN* (siMYCN) or non-targeting control siRNA (siControl), and the mRNA expression of *MYCN* was determined by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction at 24, 48 and 72 h post-transfection and normalized to the house-keeping gene *TBP*. Data are presented as the mean \pm standard deviation of 4 biological replicates and were standardized to the siControl. Statistical significances were calculated using the paired Student t-test. ** $P < 0.01$, as indicated. (B) The cell viability of siMYCN or siControl transiently transfected HepT1, HUH6 and HUH7 cells was assessed at the indicated time points using MTT assays and OD measurements. The values are presented as the mean of 6 biological replicates \pm standard deviation. *MYCN*, *MYCN* proto-oncogene basic-helix-loop-helix transcription; *MYCNOS*, *MYCN* opposite strand; siRNA/si-, small interfering RNA; *TBP*, TATA-box binding protein; OD, optical density.

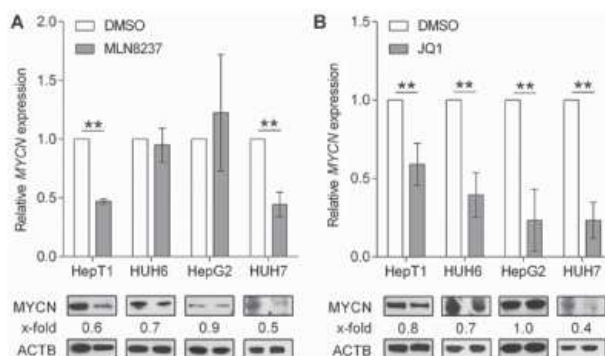


Figure 4. *MYCN* inhibition. Analysis of *MYCN*/*MYCN* mRNA and protein levels at 48 h post-treatment with vehicle (DMSO) and the *MYCN* inhibitors, (A) MLN8237 (10 μ M for HepG2, and 1.0 μ M for HepT1, HUH6, and HUH7) and (B) JQ1 (10 μ M for HepT1 and HepG2, and 0.5 μ M for HUH6 and HUH7) using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction and western blotting, respectively. The expression of *MYCN* was normalized to the mRNA levels of the house-keeping gene *TBP* and is presented as fold changes to the DMSO control. Data are presented as the mean \pm standard deviation of 3 biological replicates. ** $P < 0.01$, as indicated. Quantification of the *MYCN* protein (67 kDa) was performed via densitometry, with the fold reduction compared with the house-keeping protein *ACTB* (45 kDa) displayed on top of each band. The treated and untreated samples of each cell line were always run on the same blot and simultaneously probed with *MYCN* and *ACTB* antibodies. *ACTB* signals were detected with an exposure time of 5 sec. *MYCN* of 6 min (HUH7, HepT1 and HUH6) and 15 min (HepG2) due to their varying protein levels in the respective cell lines. *MYCN*, *MYCN* proto-oncogene basic-helix-loop-helix transcription; *MYCNOS*, *MYCN* opposite strand; *ACTB*, β -actin; DMSO, dimethyl sulfoxide; *TBP*, TATA-box binding protein.

of JQ1 led to significant reductions in the viability of HUH6 and HUH7 cells (Fig. 5B). Higher doses of 10 μ M JQ1 were required to induce a response in HepT1 and HepG2 cells (Fig. 5B). In addition, marked morphological changes were also noted following treatment with MLN8237 and JQ1, as evidenced by enlarged, rounded and swollen cells or detached and shrunken cells, respectively (Fig. 5C).

In order to analyze the cause of these morphological changes in more detail, the present study performed flow cytometry-based cell cycle analyses. MLN8237 treatment resulted in high levels of G2/M arrest and aneuploidy in all cell lines, while the fraction of cells in the G1/G0 and S phases were significantly reduced (Fig. 5D). Notably, all liver tumor cell lines exhibited an increase in the subG1 peak, which is

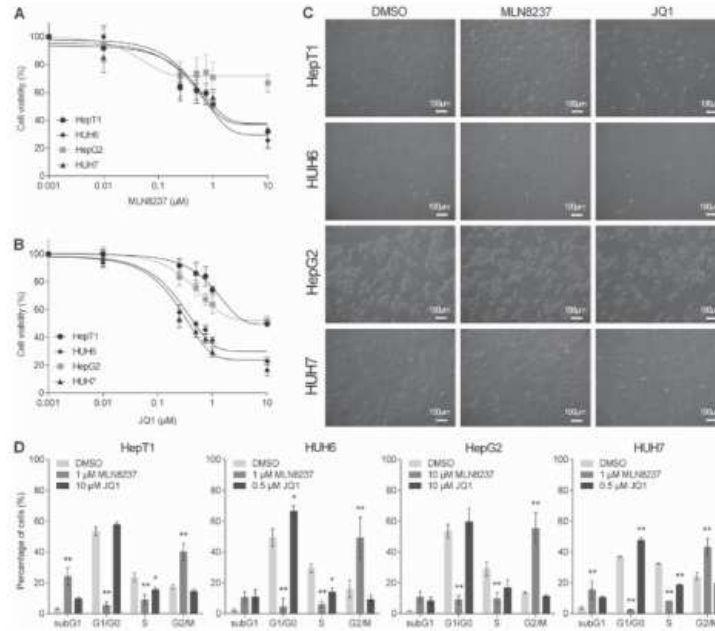


Figure 5. *MYCN* inhibition impairs cell growth. The cell viability of the hepatoblastoma cell lines (HepT1, HUH6, HepG2) and a hepatocellular carcinoma cell line (HUH7) was evaluated by MTT assay following 48 h of treatment with different concentrations (0.001, 0.01, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 10.0 μM) of (A) MLN8237 or (B) JQ1. Values are presented as the mean \pm standard deviation of 5 independent experiments performed in duplicates. (C) Morphological changes in the cell lines following 48 h of treatment with vehicle (DMSO) and MLN8237 (10 μM for HepG2, and 1.0 μM for HepT1, HUH6 and HUH7) or JQ1 (10 μM for HepT1 and HepG2, and 0.5 μM for HUH6 and HUH7) was detected by microscopy (magnification, $\times 100$; scale bars, 100 μm). (D) Flow cytometric analysis of cell cycle phases of propidium iodide-stained liver tumor cells in response to 48 h of treatment with vehicle (DMSO) and MLN8237 or JQ1 (concentrations as aforementioned). Data are presented as the mean \pm standard deviation of 3 biological replicates. Statistical significances from the two-way analysis of variance and the Bonferroni post hoc test are presented. $^*P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$ vs. DMSO. *MYCN*, *MYC* proto-oncogene basic-helix-loop-helix transcription; DMSO, dimethyl sulfoxide.

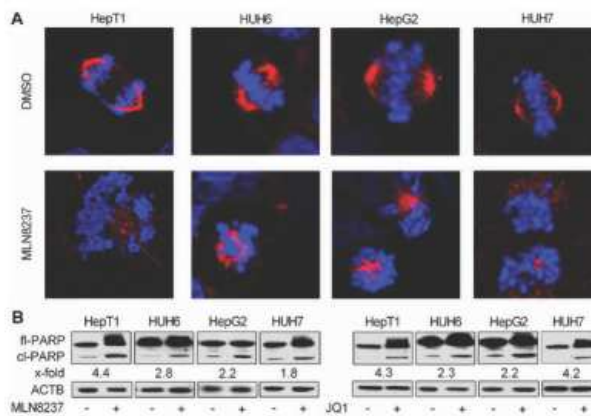


Figure 6. *MYCN* inhibition induces apoptosis. (A) Immunofluorescent staining of the spindles of liver tumor cells treated for 24 h with DMSO or MLN8237 (10 μM for HepG2, and 1.0 μM for HepT1, HUH6 and HUH7) using an antibody against α -tubulin (depicted in red). DNA was counterstained with DAPI (depicted in blue). Magnification, $\times 400$. (B) Immunoblots presenting the levels of fl-PARP protein (116 kDa), cl-PARP (89 kDa), and the house-keeping protein ACTB (45 kDa) at 48 h following the addition of DMSO, MLN8237 or JQ1 (10 μM for HepT1 and HepG2, and 0.5 μM for HUH6 and HUH7). The numbers below each of the PARP bands indicates the fold induction of cl-PARP normalized to ACTB. Treated and untreated samples of each cell line were always run on the same blot and simultaneously probed with PARP and ACTB antibodies. ACTB signals were detected with an exposure time of 5 sec, and for PARP 30 sec (HepT1 and HUH7) and 5 min (HUH6 and HepG2) due to their varying protein levels in the respective cell lines. *MYCN*, *MYC* proto-oncogene basic-helix-loop-helix transcription; DMSO, dimethyl sulfoxide; PARP, poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase; fl-, full-length; cl-, cleaved; ACTB, β -actin.

indicative of apoptotic events. In JQ1-treated cells, a strong induction of apoptosis was observed in all cell lines, as indicated by the prominent subG1 peak. In addition, significant G1/G0 arrest was detected in the HUH6 and HUH7 cells that were highly sensitive to JQ1 treatment in the viability assays (Fig. 5D). In conclusion, the MYCN inhibitors MLN8237 and JQ1 reduced cell viability and changed the morphology of liver cancer cell lines by arresting cells either in the G1/G0 or G2 phase.

MLN8237 and JQ1 cause spindle disturbances and/or apoptosis. As treatment with MLN8237, but not JQ1, led to cellular swelling and marked G2/M arrest, and is known to induce spindle pole abnormalities (22), the present study wanted to analyze if this may be due to disruption of the mitotic spindle apparatus. Using immunofluorescent staining of α -tubulin and confocal microscopy, discontinuous spindles and missegregated chromosomes in MLN8237-treated cells were observed, whereas control cells displayed a proper spindle apparatus and nicely ordered chromosomes in metaphase (Fig. 6A).

As flow cytometric analysis of MLN8237- and JQ1-treated cells showed a marked induction of apoptosis as evidenced by the fragmented DNA in the subG1 peak, the present study wanted to further corroborate this finding via a qualitative apoptosis assay. Western blot analysis revealed high levels of proteolytically cleaved PARP, a known downstream event elicited by caspase-induced apoptosis, following MYCN inhibition by MLN8237 and JQ1. This result confirms the assumption that the two MYCN inhibitors exert their anti-proliferative capabilities at least in part through apoptosis (Fig. 6B).

Discussion

Molecular profiling of HB serves an important role in stratifying patients into different risk groups (4). Due to the strikingly low mutation rate, molecular stratification of HB is largely determined by gene expression rather than genetic events (3). While the 16-gene HB classifier is already able to divide patients into 2 distinct risk groups based on gene expression signatures, additional biomarkers are required to predict the efficacy of targeted therapeutics (10). The present study revealed that *MYCN* and *MYCNOS* expression was significantly upregulated in HB. Furthermore, *MYCN* expression appeared to be a positive predictive marker for the response to MYCN inhibition, since HB cells with high *MYCN* expression were more susceptible to MLN8237 and JQ1 treatment. Therefore, *MYCN* and *MYCNOS* might be useful biomarkers for patients with HB in predicting their response to treatment with MYCN inhibitors.

It is the patients in the high-risk group who would particularly benefit from a more targeted therapy approach, as they are normally treated with a combination of cisplatin and doxorubicin (23). These two chemotherapeutic agents cause common immediate side effects and doxorubicin in particular has severe late effects including cardiomyopathy, congestive heart failure and the development of secondary malignancies that can arise years after the treatment has been completed (24,25). Previous studies on other solid types of

cancer have shown promising synergies when combining a cisplatin-backbone with either JQ1 or MLN8237 (26,27). It seems reasonable that HB patients with *MYCN* overexpressing tumors might also benefit from a combined regimen of cisplatin and a MYCN inhibitor, thereby reducing overall chemotherapy doses and preventing the subsequent effects from the more toxic and untargeted agents such as doxorubicin.

While *MYC* is the most common deregulated protooncogene in human cancers, *MYCN* deregulation is rare and seems to serve a specific role in pediatric malignancies (28,29). *MYCN* expression is strictly controlled during embryonal development and the activation of *MYCN* expression can be observed in a variety of pediatric tumors including neuroblastoma, medulloblastoma, rhabdomyosarcoma and gliomas (30). Activation of *MYCN* in these tumors is generally caused by amplification or alterations in other oncogenes that are able to enhance the expression of *MYCN* or stabilize its protein. *MYCNOS* has been shown to positively regulate *MYCN* expression in rhabdomyosarcoma and neuroblastoma harbouring *MYCN*-amplifications (31). Although *MYCN* is not amplified in HB, the present results suggest that *MYCNOS* may be an important driver of *MYCN* overexpression in HB.

Notably, a recent study reported that *MYCN* was able to directly bind the promoter region of Lin-28 homolog B (*LIN28B*) and activate its transcription in neuroblastoma. In fact, *MYCN* expression exhibited a strong positive correlation to *LIN28B* expression in primary neuroblastoma (32). Another previous study demonstrated that elevated *LIN28B* expression in neuroblastoma was in turn capable of interfering with the let-7 mediated repression of *MYCN* (33). *LIN28B* is able to sequester let-7, leading to elevated *MYCN* expression and neuroblastoma formation in mice (31). *LIN28B* is also a known driver of HB as well as other liver-associated malignancies and its overexpression was shown to be sufficient for HB initiation and maintenance in mice (34). Notably, the present study detected a strong correlation between *LIN28B* and *MYCN* expression in primary HB tissues (data not shown), which is suggestive of an additional mechanism to trigger *MYCN* overexpression, similar to the mechanisms observed in neuroblastoma.

In conclusion, the results of the present study suggest that *MYCN* overexpression may be a common feature of pediatric liver malignancies, comprising HB, TLCT and HCC. While there seem to be various mechanisms through which *MYCN* overexpression arises, *MYCN* itself appears to be a promising biomarker for HB. Targeting *MYCN* with small molecules such as MLN8237 and JQ1 may help to improve outcomes and reduce the long-term effects of conventional chemotherapy protocols in patients with HB. However, preclinical testing of the therapeutic efficacy of these inhibitors in patient-derived HB xenograft models (35) is an absolute necessity.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the assistance of Ms. Fatemeh Promoli and Ms. Marion Bertow for their technical support, Dr. Rebecca Maxwell for critically reviewing the manuscript and Professor Torsten Pietsch (Institute of Neuropathology, University of Bonn, Bonn, Germany) for supplying the HepT1 cell line.

Funding

The present study was supported by the Bettina Bräu Foundation (Munich, Germany) and the Gänseblümchen Foundation (Voerde, Germany).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

CE designed experiments, acquired, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. AB interpreted the data and wrote the manuscript. CV analyzed the histopathology results and provided the samples. KB and BH contributed and analyzed the clinical data and gave scientific advice. DvS provided the samples, contributed and analyzed clinical data and critically reviewed the manuscript for important intellectual content. RK conceived the study, obtained funding, designed the experiments, analyzed and interpreted the data, wrote the manuscript, and directed the overall research. All authors discussed the results and implications, and reviewed and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Written informed consent was obtained from each patient and the study protocol was approved by the Ethics Committee of Ludwig-Maximilian-University (Munich, Germany; no. 431-11).

Patient consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Mann JR, Kasthuri N, Raafat F, Pincott JR, Parkes SE, Muir KR, Ingram LC and Cameron AH: Malignant hepatic tumours in children: Incidence, clinical features and aetiology. *Paediatr Perinat Epidemiol* 4: 276-289, 1990.
2. Zimmermann A: The emerging family of hepatoblastoma tumours: From ontogenesis to oncogenesis. *Eur J Cancer* 41: 1503-1514, 2005.
3. Eichenmüller M, Trippel F, Kreuder M, Beck A, Schwarzmayr T, Häberle B, Cairo S, Leuschner I, von Schweinitz D, Strom TM, *et al.*: The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. *J Hepatol* 61: 1312-1320, 2014.
4. Sumazin P, Chen Y, Treviño LR, Sarabia SF, Hampton OA, Patel K, Mistretta TA, Zorman B, Thompson P, Heczey A, *et al.*: Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups. *Hepatology* 65: 104-121, 2017.
5. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, *et al.*: Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8847-8851, 1998.

6. Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, Nagorney DM, Burgart LJ, Roche PC, Smith DI, *et al.*: Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* 21: 4863-4871, 2002.
7. Mokkapati S, Niopek K, Huang L, Cunniff KJ, Ruteshouser EC, deCaestecker M, Finegold MJ and Huff V: β -catenin activation in a novel liver progenitor cell type is sufficient to cause hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma. *Cancer Res* 74: 4515-4525, 2014.
8. Buendia MA: Unravelling the genetics of hepatoblastoma: Few mutations, what else? *J Hepatol* 61: 1202-1204, 2014.
9. Klijn C, Durinck S, Stawiski EW, Haverty PM, Jiang Z, Liu H, Degenhardt J, Mayba O, Gnad F, Liu J, *et al.*: A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines. *Nat Biotechnol* 33: 306-312, 2015.
10. Cairo S, Armengol C, De Reyniès A, Wei Y, Thomas E, Renard CA, Goga A, Balakrishnan A, Semeraro M, Gresh L, *et al.*: Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/ β -catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell* 14: 471-484, 2008.
11. Weber RG, Pietsch T, von Schweinitz D and Lichter P: Characterization of genomic alterations in hepatoblastomas. A role for gains on chromosomes 8q and 20 as predictors of poor outcome. *Am J Pathol* 157: 571-578, 2000.
12. Vita M and Henriksson M: The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* 16: 318-330, 2006.
13. Schwab M, Westermann F, Hero B and Berthold F: Neuroblastoma: Biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 4: 472-480, 2003.
14. Kretzner L, Blackwood EM and Eisenman RN: Transcriptional activities of the Myc and Max proteins in mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 182: 435-443, 1992.
15. Kress TR, Sabò A and Amati B: MYC: Connecting selective transcriptional control to global RNA production. *Nat Rev Cancer* 15: 593-607, 2015.
16. Eichenmüller M, Gruner I, Hagl B, Häberle B, Müller-Höcker J, von Schweinitz D and Kappler R: Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. *Hepatology* 49: 482-490, 2009.
17. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
18. Vadie N, Saayman S, Lenox A, Ackley A, Clemson M, Burdach J, Hart J, Vogt PK and Morris KV: MYCNOS functions as an antisense RNA regulating MYCN. *RNA Biol* 12: 893-899, 2015.
19. Baylin SB and Ohm JE: Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6: 107-116, 2006.
20. Brockmann M, Poon E, Berry T, Carstensen A, Deubzer HE, Rycak L, Jamin Y, Thway K, Robinson SP, Roels F, *et al.*: Small molecule inhibitors of aurora-a induce proteasomal degradation of N-myc in childhood neuroblastoma. *Cancer Cell* 24: 75-89, 2013.
21. Schnepf RW and Maris JM: Targeting MYCN: A good BET for improving neuroblastoma therapy? *Cancer Discov* 3: 255-257, 2013.
22. Asteriti IA, Giubettini M, Lavia P and Guarguaglini G: Aurora-A inactivation causes mitotic spindle pole fragmentation by unbalancing microtubule-generated forces. *Mol Cancer* 10: 131, 2011.
23. Hiyama E: Pediatric hepatoblastoma: Diagnosis and treatment. *Transl Pediatr* 3: 293-299, 2014.
24. Sivaprakasam P, Gupta AA, Greenberg ML, Capra M and Nathan PC: Survival and long-term outcomes in children with hepatoblastoma treated with continuous infusion of cisplatin and doxorubicin. *J Pediatr Hematol Oncol* 33: e226-e230, 2011.
25. Lipshultz SE, Sambatakos P, Maguire M, Karnik R, Ross SW, Franco VI and Miller TL: Cardiotoxicity and cardioprotection in childhood cancer. *Acta Haematol* 132: 391-399, 2014.
26. Sehdev V, Peng D, Soutto M, Washington MK, Revetta F, Ecsedy J, Zaika A, Rau TT, Schneider-Stock R, Belkhir A, *et al.*: The aurora kinase A inhibitor MLN8237 enhances cisplatin-induced cell death in esophageal adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 11: 763-774, 2012.
27. Zanellato I, Colangelo D and Osella D: JQ1, a BET inhibitor, synergizes with cisplatin and induces apoptosis in highly chemoresistant malignant pleural mesothelioma cells. *Curr Cancer Drug Targets* 18: 816-828, 2018.
28. Kalkat M, De Melo J, Hickman KA, Lourenco C, Redel C, Reseta D, Tamachi A, Tu WB and Penn LZ: MYC Deregulation in Primary Human Cancers. *Genes (Basel)* 8: 8, 2017.
29. Sala A: Editorial: Targeting MYCN in Pediatric Cancers. *Front Oncol* 4: 330, 2015.

30. Rickman DS, Schulte JH and Eilers M: The Expanding World of N-MYC-Driven Tumors. *Cancer Discov* 8: 150-163, 2018.
31. O'Brien EM, Selve JL, Martins AS, Walters ZS and Shipley JM: The long non-coding RNA MYCNOS-01 regulates MYCN protein levels and affects growth of MYCN-amplified rhabdomyosarcoma and neuroblastoma cells. *BMC Cancer* 18: 217, 2018.
32. Beckers A, Van Peer G, Carter DR, Gartlgruber M, Herrmann C, Agarwal S, Helmsmoortel HH, Althoff K, Molenaar JJ, Cheung BB, *et al*: MYCN-driven regulatory mechanisms controlling LIN28B in neuroblastoma. *Cancer Lett* 366: 123-132, 2015.
33. Molenaar JJ, Domingo-Fernández R, Ebus ME, Lindner S, Koster J, Drabek K, Mestdagh P, van Sluis P, Valentijn LJ, van Nes J, *et al*: LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nat Genet* 44: 1199-1206, 2012.
34. Nguyen LH, Robinton DA, Seligson MT, Wu L, Li L, Rakheja D, Comerford SA, Ramezani S, Sun X, Parikh MS, *et al*: Lin28b is sufficient to drive liver cancer and necessary for its maintenance in murine models. *Cancer Cell* 26: 248-261, 2014.
35. Nicolle D, Fabre M, Simon-Coma M, Gorse A, Kappler R, Nonell L, Mallo M, Haidar H, Déas O, Mussini C, *et al*: Patient-derived mouse xenografts from pediatric liver cancer predict tumor recurrence and advise clinical management. *Hepatology* 64: 1121-1135, 2016.

High expression of IGF2-derived intronic miR-483 predicts outcome in hepatoblastoma

Jakob Benjamin Wilhelm Weiss^{a,b,1}, Alexandra Elisabeth Wagner^{a,1}, Corinna Eberherr^a, Beate Häberle^a, Christian Vokuhl^c, Dietrich von Schweinitz^a and Roland Kappler^{a,*}

^a*Department of Pediatric Surgery, Dr. von Hauner Children's Hospital, University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany*

^b*Department of Plastic and Hand Surgery, Medical Center, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany*

^c*Institute of Pathology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany*

Abstract.

BACKGROUND: The role of microRNAs (miRs) as biomarkers to predict outcome in hepatoblastoma (HB), the most common malignant liver tumor in childhood, has still to be determined. Recently, the so-called four-miR signature has been described to efficiently stratify HB patients according to their prognosis.

OBJECTIVE: We examined the recently described four-miR signature for its clinical relevance in an independent validation cohort of HB patients and tried to optimize its predictive value by analyzing four additional miRs involved in HB biology.

METHODS: Expression of eight miR was determined in 29 tumor and 10 normal liver samples by TaqMan assays and association studies and Kaplan-Meier estimators determined their clinical relevance.

RESULTS: Stratifying HB patients by the four-miR signature showed no difference in patients' outcome, which was also reflected by the lack of association with any clinical risk parameter. Adding miR-23b-5p and miR-23b-3p did also not increase its discriminating power. However, the integration of miR-483-5p and miR-483-3p into the four-miR signature could predict patients with poor outcome that were associated with large tumors and vessel invasive growth with high accuracy.

CONCLUSIONS: The expansion of the four-miR signature by miR-483 serves as a useful biomarker to predict outcome of HB patients.

Keywords: Hepatoblastoma, biomarker, microRNA, four-miR signature, miR-483, IGF2, prognosis

1. Introduction

The discovery of microRNAs (miRs) in 1993 has opened an entirely new level of regulation of gene expression [1]. These short, non-coding RNA molecules of 17–23 nucleotides length are regulators of most physiological and pathological aspects of cell biology by binding to the 3'-untranslated regions of target messen-

ger RNAs (mRNAs) via imperfect base pairing, inducing translational repression or mRNA degradation [2]. One miR is able to regulate a set of several mRNAs, while one mRNA can be regulated by several miRs [3]. The importance of miRs in various malignancies has emerged, since they can act either as oncogenes [4,5] or as tumor suppressors [6]. Besides its gene regulatory function miRs can also serve as diagnostic and therapeutic tools in oncology [7]. Tong et al. were able to identify a 16-miR signature to predict cancer relapse in prostate cancer by measuring miR expression in the tumor [8]. Moreover, circulating miRs can be predictors for relapse in prostate cancer [9]. Clusters of circulating miRs were described to be able to predict the occurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) in cir-

¹Contributed equally.

*Corresponding author: Roland Kappler, Department of Pediatric Surgery, Dr. von Hauner Children's Hospital, University Hospital, LMU Munich, Lindwurmstr. 2a, D-80337 Munich, Germany. Tel.: +49 89 4400 57810; Fax: +49 89 4400 57815; E-mail: roland.kappler@med.uni-muenchen.de.

rhotic patients [10] or the risk of disease progression in patients with chronic hepatitis B [11]. Zhang et al. established a 3-miR signature that was able to identify early stage and low-level alpha fetoprotein (AFP) HCC patients [12].

Hepatoblastoma (HB) is the most common malignant childhood liver tumor with a yearly incidence of 1.5 per 1,000,000. The clinical outcome of HB patients strongly depends on the age and the serum AFP level at diagnosis, local extend of the disease, and the presence of metastases [13]. Moreover, defining the tumor extend in the liver before any treatment by the radiology-based pretreatment extent of disease (PRETEXT) staging system is of clinical relevance [14]. Standard risk patients with no clinical risk factors have an excellent prognosis of 90% overall survival (OS) [15]. However, high risk patients with advanced age (> 8 years), low serum AFP (< 100 ng/mL), extrahepatic, vessel invasive, large PRETEXT IV or metastatic HB still face a poor outcome of 50% OS [16,17]. Cairo et al. could show that outcome is also predictable by certain gene expression patterns [18]. They described a 16-gene signature that is based on the measurement of eight genes implicated in normal liver homeostasis (APCS, CYP2E1, AQP9, C1S, APOC4, HPD, GHR, ALDH2) and eight genes associated with proliferative aspects of tumor cells (RPL10A, NLE1, E2F5, DLGAP5, BUB1, IGSF1, AFP, DUSP9). Tumors with high expression predominantly of the former genes are defined as group C1 and have a better outcome, whereas tumors with high expression predominantly of the latter genes as group C2 with worse outcome [18]. In 2010 they showed, that the outcome could also be discriminated by a 4-miR signature [19]. By analyzing the differential expression of miR-371, miR-373, miR-100 and let-7a, they were able to discriminate patients with good or poor overall survival (Cm1 or Cm2, respectively). All miRs included in the 4-miR signature are regulated by MYC, which is one of the crucial players in the development of HB [19]. Besides those four miRs, only limited data exist on other prognostic miRs. One potential candidate is miR-23b, which was already measured by Cairo et al. [19], and has been previously described as a tumor suppressor in various cancers [20,21] and a target of MYC [22]. Furthermore, miR-23b-3p displays a prognostic biomarker in HCC, as patients with low miR-23b-3p expression had higher rates of vascular invasion and metastases as well as poorer survival than patients with high expression levels [23]. Another potential candidate is miR-483, which has already been described to play an oncogenic role in various human cancers, including

liver cancer [24]. In HCC, significant upregulation of miR-483-5p could be associated with short-term recurrence and promoted invasion and metastasis *in vitro* by downregulation of activated leukocyte cell adhesion molecule [25]. Similar results could be identified by Ma et al., who described its positive role in proliferation of mouse HCC cells by downregulation of suppressor of cytokine signaling 3 [26]. In Wilms' tumors, a pediatric cancer of the kidney, miR-483-5p was analyzed as part of a positive feedback loop by upregulation of its host gene insulin like growth factor 2 (*IGF2*) itself and could be correlated with increased tumorigenesis *in vivo* [27]. Interestingly, Wilms tumor and HB are both associated with the Beckwith-Wiedemann syndrome, a congenital overgrowth and cancer predisposition disorder that is caused by disruption of genomic imprinting at the *IGF2*/miR-483 locus on chromosome 11p15.5 [28].

In the present study, we examined the clinical relevance of the four-miR signature in an independent cohort of HB patients and determined the prognostic role of miR-23b and miR-483 expression in HB.

2. Materials and methods

2.1. Patient samples

We recruited 29 patients diagnosed with HB undergoing surgical resection in our department. Ten normal liver samples were obtained from HB patients during the surgical tumor resection. Fresh frozen samples were stored in liquid nitrogen until examination. Diagnosis of HB was confirmed by the reference pathology center in Kiel, Germany. Clinical data were retrieved from the German Pediatric Liver Tumor Register in Munich. Experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject. The study conforms with the code of ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and was approved by the ethics board of the University of Munich (no. 431-11).

2.2. MicroRNA analysis by real-time PCR

Isolation of total RNA of HB and liver tissue was performed using the Tri Reagent[®] (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) method according to the manufacturer's protocol. MicroRNA relative expression was measured using the TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit and TaqMan[®] MicroRNA Assays (all from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for let-7a (#000377), miR-100 (#000437),

miR-371 (#000559), miR-373 (#000561), miR-23b-5p (#000400), miR-23b-3p (#002126), miR-483-5p (#002338), and miR-483-3p (#002339) as well as RNU43 (#001095) as a housekeeping miR. The manufacturer's protocol was modified as follows: reverse transcription was performed with 10 ng of total RNA simultaneously for two target miRs and the housekeeping miR in one reaction using the respective reverse transcription primers. Quantitative real-time PCR was performed using 1 µl of reverse transcription product, 1 µl of PCR primer, 10 µl of Universal Mastermix and 8 µl of nuclease free water on a Realplex2 cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Relative expression values were calculated by dividing the expression of each individual miR by the expression of the housekeeping miR RNU43.

2.3. Statistical analysis

For comparison of miR expression in different samples we used unpaired *t*-test. Pearson *r* correlation test was used to analyze dependency of expression between miRs. Patient survival in different groups was estimated using Kaplan-Meier plots. Results were considered statistically significant when the *P*-value was < 0.05. All calculations were done with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Patients' characteristics

A total of 29 HB specimens and 10 normal healthy liver tissue samples (NL) were collected. Of the 29 HB cases, 14 were from female and 15 from male patients (Table 1). They were on average 34.5 months old at the time of diagnosis. The average serum alpha fetoprotein (AFP) at diagnosis was 348,161 ng/mL. The diagnosis was HB in 25 patients, and transitional liver cell tumor (TLCT) according to Prokurat et al. [29] in 4 patients. Twenty were classified epithelial, whereas 9 were mixed type. PRETEXT (pretreatment extent of disease) staging showed 3 patients with PRETEXT I, 5 with PRETEXT II, 13 with PRETEXT III and 8 with PRETEXT IV. Multifocal tumor growth was found in 11, vessel invasive in 9, extrahepatic in 2, and metastatic in 11 out of 29 HB patients. Seven out of 29 HB patients died of disease to date, and 13 patients had the adverse C2 subtype of the 16-gene signature according to Cairo and colleagues [18].

Table 1
Study population characteristics (n = 29)

| Characteristic | Number |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| Male/female | 15/14 |
| Average (range) age at diagnosis | 34.5 (0–114) months |
| Average (range) AFP at diagnosis | 348,161 ng/mL (609–1,947,000 ng/mL) |
| Diagnosis | 4 TLCT/25 HB |
| Histology subtype | 20 epithelial/9 mixed |
| PRETEXT | |
| I | 3 |
| II | 5 |
| III | 13 |
| IV | 8 |
| Multifocal | 11 |
| Vessel invasive | 9 |
| Extrahepatic | 2 |
| Metastatic | 11 |
| Died of disease | 7 |
| C1/C2 (16-gene signature) [19] | 16/13 |

3.2. Evaluation of the four-miR signature in an independent HB population

We conducted an expression analysis to assess the capacity of the four miRs let-7a, miR-100, miR-371, and miR-373 to stratify HB patients according to their prognosis. Expression analysis of let-7a (Fig. 1A) and miR-100 (Fig. 1B) showed no differences in expression levels between NL and tumor samples, but correlated mildly to each other (Fig. 1C). In contrast, expression levels of the two miRs miR-371 (Fig. 1D) and miR-373 (Fig. 1E) revealed a significant upregulation in HB tumor samples compared to NL, with a very strong correlation of both miR expression values (Fig. 1F).

Based on the four-miR expression profile, tumor samples were then classified as either Cm1 or Cm2 according to Cairo and colleagues [19]. Kaplan-Meier estimator comparing both groups of patients displayed no difference in overall survival (Fig. 1G). Along this line, Cm1 and Cm2 grouping was not associated with clinicopathological risk factors such as age at diagnosis > 5 years, invasion into vessels, mixed or predominant fetal histology, PRETEXT IV, extrahepatic, metastatic and multifocal growth (Fig. 1H). However, the four-miR signature was significantly associated with the 16-gene signature (Fig. 1H), from which it has been initially deduced [18].

3.3. Determining miR-23b and miR-483 expression in HB

Next, we investigated the role of miR-23b and miR-483 in HB. As their role in HB patient samples was completely unknown, we examined both the 5' tran-

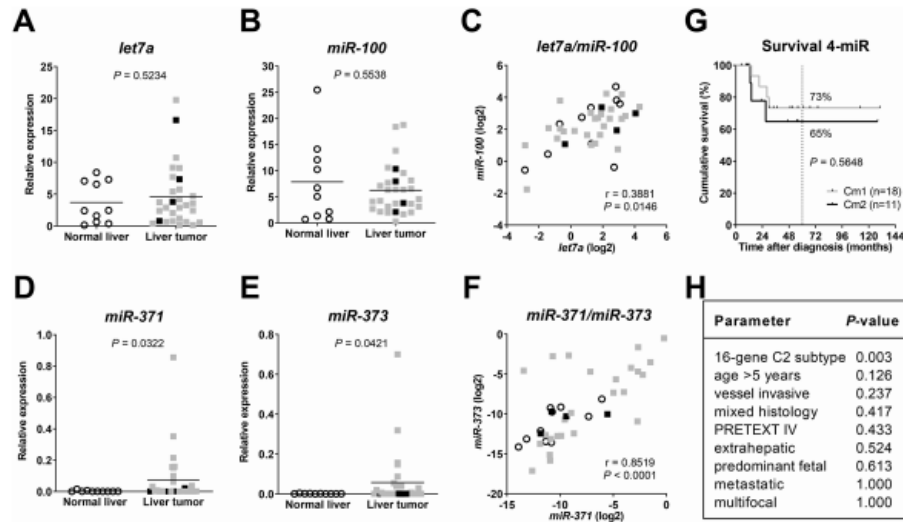


Fig. 1. Relative expression of (a) let-7a, (b) miR-100, (d) miR-371, and (e) miR-373 in normal liver and liver tumor samples, as determined by quantitative RT-PCR and normalized to the expression of house-keeping miR RNU43. Mean expression is given as a horizontal line. Significances were determined by unpaired *t*-test with Welch's correction and *P*-values are given. (c-f) Correlation of the log₂-transformed expression of (c) let7 and miR-100 and (f) miR-371 and miR-373 was calculated using Spearman *r* correlation. Black circles depict normal liver samples, grey squares hepatoblastoma, black squares transitional liver cell tumors. (g) Overall survival of patients with hepatoblastoma stratified according to the four-miR signature into a Cm1 and Cm2 group. (h) Association analysis of the four-miR signature with clinicopathological characteristics using Fisher's exact test with *P*-values given.

script (-5p) and its 3' (-3p) counterpart for both miRNAs. The relative expression of miR-23b-5p (Fig. 2A) and miR-23b-3p (Fig. 2B) in HBs showed no significant difference to NL tissues, but their expression values correlated positively (Fig. 2C). This was to be expected, since they are processed from the same hairpin precursor [30]. Of note, the mean relative expression of miR-23b-5p in all samples was approximately 200-times higher than the one of miR-23b-3p.

Then, we analyzed the expression of the two mature transcript variants -5p and -3p of miR-483 in HB patients. Significantly higher expression levels could be detected for miR-483-5p in tumor compared to NL samples (Fig. 2D). Although miR-483-3p followed the same trend, this was statistically not significant (Fig. 2E). As anticipated, a strong and highly significant correlation of both variants was found (Fig. 2F).

3.4. Integration of miR-483 into the four-miR signature predicts outcome

One of the main findings of Cairo et al. was that the 4 miR signature is able to predict outcome of pa-

tients [19]. As we were not able to validate this finding in our cohort (Fig. 1G), we tried to refine the set of miRNAs and first integrated miR23b-5p and miR23b-3p into the original set of the four-miR signature. However, there was again no difference in overall survival (Fig. 2G). Then, by integrating both variants of miR-483 into the four-miR signature, Kaplan-Meier-survival analysis revealed distinct groups with significantly different outcome (Fig. 2H).

We then investigated if the new six-miR signature is associated with any clinical risk factors [31]. We found that C_{m2} patients that have a poor outcome (Fig. 2H) are significantly associated having large PRETEXT IV and vessel invasive tumors (Fig. 3A and B). All other clinical features were not significant.

4. Discussion

Standard risk HB patients have an excellent outcome of 90% OS, if treated according to the guidelines of SIOPEL [13]. However, high-risk patients still face a poor outcome of 50% OS [17]. In the last decades, nu-

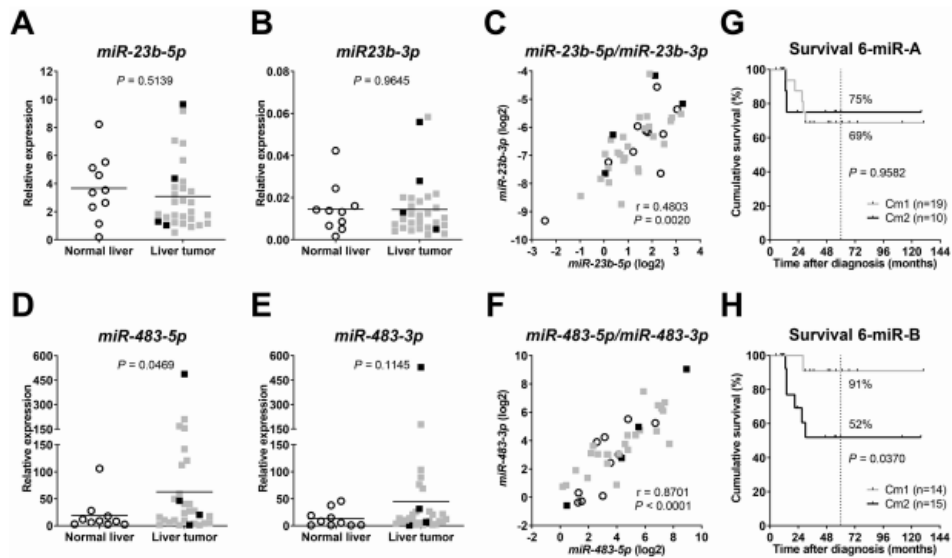


Fig. 2. Relative expression of (a) miR-23b-5p, (b) miR-23b-3p, (d) miR-483-5p, and (e) miR-483-3p in normal liver and liver tumor samples, as determined by quantitative RT-PCR and normalized to the expression of house-keeping miR RNU43. Mean expression is given as a horizontal line. Significances were determined by unpaired *t*-test with Welch's correction and *P*-values are given. (c+f) Correlation of the log₂-transformed expression of (c) miR-23b-5p and miR-23b-3p and (f) miR-483-5p and miR-483-3p was calculated using Spearman *r* correlation. Black circles depict normal liver samples, grey squares hepatoblastoma, black squares transitional liver cell tumors. (g+h) Overall survival of patients with hepatoblastoma stratified according to the four-miR signature with additional integration of either (g) miR-23-5p and miR-23-3p or (h) miR-483-5p and miR483-3p into a Cm1 and Cm2 group. Statistical significance was calculated using the Mantel-Cox test and *P*-values are given.

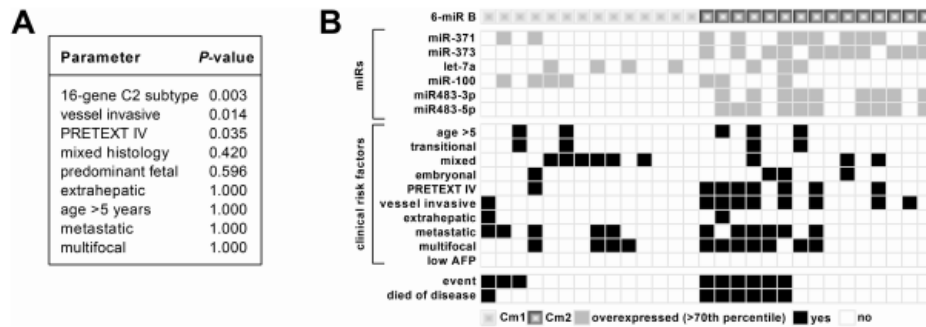


Fig. 3. (a) Association analysis of the six-miR signature with clinicopathological characteristics using Fisher's exact test with *P*-values given. (b) Clinicopathological characteristics and the expression of the six-miR signature are color-coded and depicted in columns for each tumor of our cohort of 25 hepatoblastoma and 4 transitional liver cell tumor patients.

merous studies have identified the involvement of miRNAs in the initiation and progression of many cancer types by acting as tumor suppressors or oncogenes [32,33]. As in other types of cancer, several reports proved the

importance of miRNAs in HB development and metastasis [34–36]. Thus, the present study aimed at defining miRNAs that can be used as prognostic biomarkers in HB.

As described by Cairo et al., the four-miR-signature

consisting of miR-373, miR-371, miR-100 and let-7a can be used to predict outcome of HB patients [19]. To evaluate the robustness of the four-miR signature in an independent cohort of HB patients, we first determined the expression levels of the four miRs and then stratified patients into the Cm1 and Cm2 group according to Cairo et al. [19]. However, we were not able to reproduce the finding of Cairo et al., as patients stratified according to the four-miR signature had no difference in OS. One possible explanation for this discrepancy could be the expression pattern of the individual miRs, which showed only for miR-371 and miR-373 a significant upregulation in the tumors compared to normal liver tissues, whereas let-7a and miR-100 exhibited comparable expression levels. It is worth mentioning that miR-371 and miR-373 as well as let-7a and miR-100 are located next to each other in clusters on chromosome 19q13.4 [37] and 11q24.1 [38], respectively, and are usually co-expressed. Consistent with this, we found a significant correlation of miR-371 and miR-373 expression as well as let-7a and miR-100 expression in our study, but this was much stronger for the former two miRs. Altogether, this first set of data suggests that the predictive power of the four-miR signature, presumably due to the ambiguity of the let-7a and miR-100 cluster, could not be validated in our cohort of 29 HB patients and should be improved to be used for further prognostication.

Thus, we wanted to investigate the prognostic power of two new miRs in HB patients, namely miR-23b and miR-483. Although the 5' mature products (-5p) of the pre-miRs are generally considered the dominant miR, the 3' (-3p) can still be functional, which led us to investigate both variants [39].

MiR-23b was previously described as a tumor suppressor miR in various cancers [20,21] and as a biomarker for HCC, whereby low expression of miR-23b is indicative of metastases, vascular infiltration and poor survival [23]. Of note, miR-23b was one of the co-regulated miRs to let-7a and miR-100 in the initial study by Cairo et al., which all showed downregulation in the adverse HB subtype [19]. In our study, we found no significant differences for both variants of miR-23b in HB compared to normal liver tissue and expression levels were not associated with any clinical parameters. Consistently, integration of miR23b-5p and miR23b-3p into the four-miR signature only led to minor changes in the group assignment and therefore could not improve the discriminating power using the Kaplan-Meier survival estimator. As miR-23b together with let-7a and miR-100 are repressed by the MYC oncogene that con-

tributes to the biology of immature HBs [40], classified as Cm2 [19], it is safe to predict that all three miRs show a similar transcriptional regulation and thus are unsuitable for improving the four-miR signature in HB.

The miR-483 gene is located on chromosome 11p15.5 in the second intron of the *IGF2* gene and is implicated in several pathologies [24,26,41,42]. So far, the co-regulation with *IGF2* and the transcriptional induction by β -catenin are the suggested mechanisms that explain the upregulation of miR-483 found in many cancer types [43]. Intriguingly, *IGF2* overexpression and *CTNNB1* mutations leading to β -catenin accumulation are key drivers of HB development and progression [44–47]. In our study population, we found a significant upregulation of miR-483, predominantly of the dominant 5' mature form, in HB compared to normal liver tissue. Moreover, high expression levels of miR-483 were significantly associated with large PRETEXT IV, which displays a well-known risk factor in HB [31]. Accordingly, integration of both transcript variants of miR-483 into the four-miR signature strongly influenced the group allocation to Cm1 and Cm2 and significantly improved stratification efficiency in terms of overall survival using the Kaplan-Meier estimator. This is in line with several reports linking overexpression of miR-483 to aggressive liver tumor cell behavior and poor clinical outcome of adult HCC patients [24–26,48,49]. Only one study on HCC patients reported that miR-483 upregulation is clinically favorable, namely indicative for a reduced risk for recurrence [50].

Collectively, our results clearly show that the inclusion of miR-483 into the four-miR signature discriminates patients with good and poor outcome and might help to improve biomarker-assisted stratification of HB patients into different risk groups. However, further studies with a larger population size are necessary to substantiate our findings.

Acknowledgments

We acknowledge the assistance of Fatemeh Promoli for technical support.

The study was funded by the Friedrich Baur Foundation (Munich, Germany) and the Weigand Foundation (Munich, Germany).

References

- [1] R.C. Lee, R.L. Feinbaum and V. Ambros, The C. elegans

- heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14, *Cell* **75**(5) (1993), 843–854.
- [2] J.G. Doench, C.P. Petersen and P.A. Sharp, siRNAs can function as miRNAs, *Genes & Development* **17**(4) (2003), 438–442.
- [3] J.G. Doench and P.A. Sharp, Specificity of microRNA target selection in translational repression, *Genes & Development* **18**(5) (2004), 504–511.
- [4] H. Liu, L. Cheng, D. Cao and H. Zhang, Suppression of miR-21 expression inhibits cell proliferation and migration of liver cancer cells by targeting phosphatase and tensin homolog (PTEN), *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* **24** (2018), 3571–3577.
- [5] Y. Lu, B. Han, H. Yu, Z. Cui, Z. Li and J. Wang, Berberine regulates the microRNA-21-ITGBeta4-PDCD4 axis and inhibits colon cancer viability, *Oncology Letters* **15**(4) (2018), 5971–5976.
- [6] A. Esquela-Kerscher, P. Trang, J.F. Wiggins, L. Patrawala, A. Cheng, L. Ford, J.B. Weidhaas, D. Brown, A.G. Bader and F.J. Slack, The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer, *Cell Cycle* **7**(6) (2008), 759–764.
- [7] V. Armand-Labit and A. Pradines, Circulating cell-free microRNAs as clinical cancer biomarkers, *Biomolecular Concepts* **8**(2) (2017), 61–81.
- [8] A.W. Tong, P. Fulgham, C. Jay, P. Chen, I. Khalil, S. Liu, N. Senzer, A.C. Eklund, J. Han and J. Nemunaitis, MicroRNA profile analysis of human prostate cancers, *Cancer Gene Therapy* **16**(3) (2009), 206–216.
- [9] L.A. Selth, S.L. Townley, A.G. Bert, P.D. Stricker, P.D. Sutherland, L.G. Horvath, G.J. Goodall, L.M. Butler and W.D. Tilley, Circulating microRNAs predict biochemical recurrence in prostate cancer patients, *British Journal of Cancer* **109**(3) (2013), 641–650.
- [10] Y.H. Huang, K.H. Liang, R.N. Chien, T.H. Hu, K.H. Lin, C.W. Hsu, C.L. Lin, T.L. Pan, P.Y. Ke and C.T. Yeh, A circulating microRNA signature capable of assessing the risk of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients, *Scientific Reports* **7**(1) (2017), 523.
- [11] B. Riazalhosseini, R. Mohamed, Y.D. Apalasy, I.M. Langmia and Z. Mohamed, Circulating microRNA as a marker for predicting liver disease progression in patients with chronic hepatitis B, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **50**(2) (2017), 161–166.
- [12] Y. Zhang, T. Li, Y. Qiu, T. Zhang, P. Guo, X. Ma, Q. Wei and L. Han, Serum microRNA panel for early diagnosis of the onset of hepatocellular carcinoma, *Medicine* **96**(2) (2017), e5642.
- [13] P. Czauderna, B. Haerberle, E. Hiyama, A. Rangaswami, M. Krailo, R. Maibach, E. Rinaldi, Y. Feng, D. Aronson, M. Malogolowkin, K. Yoshimura, I. Leuschner, D. Lopez-Terrada, T. Hishiki, G. Perilongo, D. von Schweinitz, I. Schmid, K. Watanabe, M. Derosa and R. Meyers, The children’s hepatic tumors international collaboration (CHIC): Novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma and becomes a research model, *Eur J Cancer* **52** (2016), 92–101.
- [14] D.J. Roebuck, D. Aronson, P. Clapuyt, P. Czauderna, J. de Ville de Goyet, F. Gauthier, G. Mackinlay, R. Maibach, K. McHugh, O.E. Olsen, J.B. Otte, D. Pariente, J. Plaschkes, M. Childs, G. Perilongo, G. International Childhood Liver Tumor Strategy, 2005 PRETEXT: A revised staging system for primary malignant liver tumours of childhood developed by the SIOPEL group, *Pediatr Radiol* **37**(2) (2007), 123–132; quiz 249–50.
- [15] G. Perilongo, R. Maibach, E. Shafford, L. Brugieres, P. Brock, B. Morland, B. de Camargo, J. Zsiros, D. Roebuck, A. Zimmermann, D. Aronson, M. Childs, E. Widing, V. Lathier, J. Plaschkes, J. Pritchard, M. Scopinaro, G. MacKinlay and P. Czauderna, Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard-risk hepatoblastoma, *N Engl J Med* **361**(17) (2009), 1662–1670.
- [16] G. Perilongo, E. Shafford, R. Maibach, D. Aronson, L. Brugieres, P. Brock, M. Childs, P. Czauderna, G. MacKinlay, J.B. Otte, J. Pritchard, R. Rondelli, M. Scopinaro, C. Staalman and J. Plaschkes, Risk-adapted treatment for childhood hepatoblastoma. final report of the second study of the International Society of Paediatric Oncology – SIOPEL 2, *Eur J Cancer* **40**(3) (2004), 411–421.
- [17] J. Fuchs, J. Rydzynski, D. von Schweinitz, U. Bode, H. Hecker, P. Weinel, D. Burger, D. Harms, R. Ertmann, K. Oldhafer and H. Mildnerberger, Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma: A report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94, *Cancer* **95**(1) (2002), 172–182.
- [18] S. Cairo, C. Armengol, A. De Reynies, Y. Wei, E. Thomas, C.A. Renard, A. Goga, A. Balakrishnan, M. Semeraro, L. Gresh, M. Pontoglio, H. Strick-Marchand, F. Levillayer, Y. Nouet, D. Rickman, F. Gauthier, S. Branchereau, L. Brugieres, V. Lathier, R. Bouvier, F. Boman, G. Basso, J.F. Michiels, P. Hofman, F. Arbez-Gindre, H. Jouan, M.C. Rousselet-Chapeau, D. Berrebi, L. Marcellin, F. Plenat, D. Zachar, M. Joubert, J. Selves, D. Pasquier, P. Bioulac-Sage, M. Grotzer, M. Childs, M. Fabre and M.A. Buendia, Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer, *Cancer cell* **14**(6) (2008), 471–484.
- [19] S. Cairo, Y. Wang, A. de Reynies, K. Duroure, J. Dahan, M.J. Redon, M. Fabre, M. McClelland, X.W. Wang, C.M. Croce and M.A. Buendia, Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(47) (2010), 20471–20476.
- [20] M. Fulciniti, N. Amodio, R.L. Bandi, A. Cagnetta, M.K. Samur, C. Acharya, R. Prabhala, P. D’Aquila, D. Bellizzi, G. Passarino, S. Adamia, A. Neri, Z.R. Hunter, S.P. Treon, K.C. Anderson, P. Tassone and N.C. Munshi, miR-23b/SP1/c-myc forms a feed-forward loop supporting multiple myeloma cell growth, *Blood Cancer Journal* **6** (2016), e380.
- [21] W. Wang, Y. Li, N. Liu, Y. Gao and L. Li, MiR-23b controls ALDH1A1 expression in cervical cancer stem cells, *BMC Cancer* **17**(1) (2017), 292.
- [22] P. Gao, I. Tchernyshyov, T.C. Chang, Y.S. Lee, K. Kita, T. Ochi, K.I. Zeller, A.M. De Marzo, J.E. Van Eyk, J.T. Mendell and C.V. Dang, e-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism, *Nature* **458**(7239) (2009), 762–765.
- [23] R.Q. He, P.R. Wu, X.L. Xiang, X. Yang, H.W. Liang, X.H. Qiu, L.H. Yang, Z.G. Peng and G. Chen, Downregulated miR-23b-3p expression acts as a predictor of hepatocellular carcinoma progression: A study based on public data and RT-qPCR verification, *International Journal of Molecular Medicine* **41**(5) (2018), 2813–2831.
- [24] A. Veronese, L. Lupini, J. Consiglio, R. Visone, M. Ferracin, F. Fornari, N. Zanesi, H. Alder, G. D’Elia, L. Gramantieri, L. Bolondi, G. Lanza, P. Querzoli, A. Angioni, C.M. Croce and M. Negrini, Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus, *Cancer Research* **70**(8) (2010), 3140–3149.
- [25] X.Y. Lu, D. Chen, X.Y. Gu, J. Ding, Y.J. Zhao, Q. Zhao, M. Yao, Z. Chen, X.H. He and W.M. Cong, Predicting value of ALCAM as a target gene of microRNA-483-5p in patients with

- early recurrence in hepatocellular carcinoma, *Front Pharmacol* **8** (2017), 973.
- [26] N. Ma, F. Li, D. Li, Y. Hui, X. Wang, Y. Qiao, Y. Zhang, Y. Xiang, J. Zhou, L. Zhou, X. Zheng and X. Gao, Igf2-derived intronic miR-483 promotes mouse hepatocellular carcinoma cell proliferation, *Molecular and Cellular Biochemistry* **361**(1-2) (2012), 337–343.
- [27] M. Liu, A. Roth, M. Yu, R. Morris, F. Bersani, M.N. Rivera, J. Lu, T. Shioda, S. Vasudevan, S. Ramaswamy, S. Maheswaran, S. Diederichs and D.A. Haber, The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal promoters and enhances tumorigenesis, *Genes Dev* **27**(23) (2013), 2543–2548.
- [28] F. Brioude, J.M. Kalish, A. Mussa, A.C. Foster, J. Blied, G.B. Ferrero, S.E. Boonen, T. Cole, R. Baker, M. Bertoletti, G. Cocchi, C. Coze, M. De Pellegrin, K. Hussain, A. Ibrahim, M.D. Kilby, M. Krajewska-Walasek, C.P. Kratz, E.J. Ladusans, P. Lapunzina, Y. Le Bouc, S.M. Maas, F. Macdonald, K. Ounap, L. Peruzzi, S. Rossignol, S. Russo, C. Shipster, A. Skorka, K. Tatton-Brown, J. Tenorio, C. Tortora, K. Gronskov, I. Netchine, R.C. Hennekam, D. Prawitt, Z. Tumer, T. Eggermann, D.J.G. Mackay, A. Riccio and E.R. Maher, Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: An international consensus statement, *Nat Rev Endocrinol* **14**(4) (2018), 229–249.
- [29] A. Prokurat, P. Kluge, A. Kosciesza, D. Perek, A. Kappeler and A. Zimmermann, Transitional liver cell tumors (TLCT) in older children and adolescents: A novel group of aggressive hepatic tumors expressing beta-catenin, *Med Pediatr Oncol* **39**(5) (2002), 510–518.
- [30] D.P. Bartel, MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* **116**(2) (2004), 281–297.
- [31] R. Maibach, D. Roebuck, L. Brugieres, M. Capra, P. Brock, P. Dall'Igna, J.B. Otte, B. De Camargo, J. Zsiros, A. Zimmermann, D. Aronson, M. Childs, M. Scopinaro, B. Morland, J. Plaschkes, P. Czuderna and G. Perilongo, Prognostic stratification for children with hepatoblastoma: The SIOPEL experience, *Eur J Cancer* **48**(10) (2012), 1543–1549.
- [32] B. Zhang, X. Pan, G.P. Cobb and T.A. Anderson, microRNAs as oncogenes and tumor suppressors, *Dev Biol* **302**(1) (2007), 1–12.
- [33] Y.W. Kong, D. Ferland-McCollough, T.J. Jackson and M. Bushell, microRNAs in cancer management, *The Lancet. Oncology* **13**(6) (2012), e249–58.
- [34] J. von Frowein, S.M. Hauck, R. Kappler, P. Pagel, K.K. Fleischmann, T. Magg, S. Cairo, A. Roscher, D. von Schweinitz and I. Schmid, MiR-492 regulates metastatic properties of hepatoblastoma via CD44, *Liver Int* **38**(7) (2018), 1280–1291.
- [35] E. Indersie, S. Lesjean, K.B. Hooks, F. Sagliocco, T. Ernault, S. Cairo, M. Merched-Sauvage, A. Rullier, B. Le Bail, S. Taque, M. Grotzer, S. Branchereau, C. Guettier, M. Fabre, L. Brugieres, M. Hagedorn, M.A. Buendia and C.F. Grosset, MicroRNA therapy inhibits hepatoblastoma growth *in vivo* by targeting beta-catenin and Wnt signaling, *Hepatol Commun* **1**(2) (2017), 168–183.
- [36] Y. Zhang, Y. Zhao, J. Wu, S. Liangpunsakul, J. Niu and L. Wang, MicroRNA-26-5p functions as a new inhibitor of hepatoblastoma by repressing lin-28 homolog B and aurora kinase a expression, *Hepatol Commun* **2**(7) (2018), 861–871.
- [37] A.D. Zhou, L.T. Diao, H. Xu, Z.D. Xiao, J.H. Li, H. Zhou and L.H. Qu, beta-Catenin/LEF1 transactivates the microRNA-371-373 cluster that modulates the Wnt/beta-catenin-signaling pathway, *Oncogene* **31**(24) (2012), 2968–2978.
- [38] H. Lee, S. Han, C.S. Kwon and D. Lee, Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications, *Protein Cell* **7**(2) (2016), 100–113.
- [39] J.S. Yang, M.D. Phillips, D. Betel, P. Mu, A. Ventura, A.C. Siepel, K.C. Chen and E.C. Lai, Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species, *RNA* **17**(2) (2011), 312–326.
- [40] L. Swier, A. Dzikiewicz-Krawczyk, M. Winkle, A. van den Berg and J. Kluiver, Intricate crosstalk between MYC and non-coding RNAs regulates hallmarks of cancer, *Mol Oncol* **13**(1) (2019), 26–45.
- [41] K. Han, V.A. Gennarino, Y. Lee, K. Pang, K. Hashimoto-Torii, S. Choufani, C.S. Raju, M.C. Oldham, R. Weksberg, P. Rakic, Z. Liu and H.Y. Zoghbi, Human-specific regulation of MeCP2 levels in fetal brains by microRNA miR-483-5p, *Genes Dev* **27**(5) (2013), 485–490.
- [42] L. Wang, M. Shi, S. Hou, B. Ding, L. Liu, X. Ji, J. Zhang and Y. Deng, MiR-483-5p suppresses the proliferation of glioma cells via directly targeting ERK1, *FEBS Lett* **586**(9) (2012), 1312–1317.
- [43] A. Veronese, R. Visone, J. Consiglio, M. Acunzo, L. Lupini, T. Kim, M. Ferracin, F. Lovat, E. Miotto, V. Balatti, L. D'Abundo, L. Gramantieri, L. Bolondi, Y. Pekarsky, D. Perrotti, M. Negrini and C.M. Croce, Mutated beta-catenin evades a microRNA-dependent regulatory loop, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(12) (2011), 4840–4845.
- [44] S.G. Gray, T. Eriksson, C. Ekstrom, S. Holm, D. von Schweinitz, P. Kogner, B. Sandstedt, T. Pietsch and T.J. Ekstrom, Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas, *British Journal of Cancer* **82**(9) (2000), 1561–1567.
- [45] X. Li, G. Adam, H. Cui, B. Sandstedt, R. Ohlsson and T.J. Ekstrom, Expression, promoter usage and parental imprinting status of insulin-like growth factor II (IGF2) in human hepatoblastoma: Uncoupling of IGF2 and H19 imprinting, *Oncogene* **11**(2) (1995), 221–229.
- [46] M. Eichenmuller, F. Trippel, M. Kreuder, A. Beck, T. Schwarzmayr, B. Haberle, S. Cairo, I. Leuschner, D. von Schweinitz, T.M. Strom and R. Kappler, The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features, *J Hepatol* **61**(6) (2014), 1312–1320.
- [47] G.E. Tomlinson and R. Kappler, Genetics and epigenetics of hepatoblastoma, *Pediatric Blood & Cancer* **59**(5) (2012), 785–792.
- [48] L. Gailhouse, L.C. Liew, K. Yasukawa, I. Hatada, Y. Tanaka, T. Kato, H. Nakagama and T. Ochiya, MEG3-derived miR-493-5p overcomes the oncogenic feature of IGF2-miR-483 loss of imprinting in hepatic cancer cells, *Cell Death & Disease* **10**(8) (2019), 553.
- [49] S. Tang, Y. Chen, S. Feng, T. Yi, X. Liu, Q. Li, Z. Liu, C. Zhu, J. Hu, X. Yu, M. Wang, G. Cao, H. Tang, C. Bie, F. Ma, H. Tang, G. Du and J. Huang, MiR-483-5p promotes IGF-II transcription and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma, *Oncotarget* **8**(59) (2017), 99871–99888.
- [50] F. Vasuri, S. Fittipaldi, V. De Pace, L. Gramantieri, V. Bertuzzo, M. Cescon, A.D. Pinna, M. Fiorentino, A. D'Errico and M. Ravaoli, Tissue miRNA 483-3p expression predicts tumor recurrence after surgical resection in histologically advanced hepatocellular carcinomas, *Oncotarget* **9**(25) (2018), 17895–17905.